



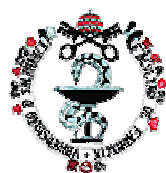
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

**DESARROLLO DE NUEVOS AGENTES
ANTIMITÓTICOS RELACIONADOS CON
COMBRETASTATINAS Y FENSTATINAS**

TESIS DOCTORAL

RAQUEL ÁLVAREZ LOZANO

Junio 2009



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Trabajo Presentado Para Optar al Grado de Doctor en Farmacia por:

Raquel Álvarez Lozano

Vº Bº

Profesor Arturo San Feliciano
Director del Departamento de Química Farmacéutica

Manuel Medarde Agustín, Catedrático de Química Orgánica y **Rafael Peláez Lamamié de Clairac Arroyo**, Profesor Titular de Química Orgánica, del Departamento de Química Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que la licenciada en Farmacia por la Universidad de Salamanca, **D^a Raquel Álvarez Lozano**, ha realizado en este Departamento, bajo su dirección, el trabajo titulado **“Desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos relacionados con combretastatinas y fenstatinas”**, para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca. Considerándolo finalizado, autorizan su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Salamanca, Marzo de 2009

Fdo. Manuel Medarde

Fdo. Rafael Peláez

La investigación realizada sobre los compuestos **16**, **17**, **73** y **74** se llevó a cabo bajo la supervisión del Dr. Andrew Westwell durante la estancia en la Universidad de Cardiff.

La financiación de la investigación en este trabajo de Tesis Doctoral ha procedido de los siguientes proyectos:

-Nuevos agentes quimioterápicos. Síntesis, estudios de actividad e interacción con tubulina. CTQ-2004-00369/BQU (Ministerio de Educación y Ciencia 2004-2007).

-Diseño, síntesis y evaluación de análogos macrocíclicos de combretastatinas y fenstatinas como agentes citotóxicos inhibidores de la polimerización de tubulina. SA090A06 (Junta de Castilla y León 2006-2008).

-Compuestos antineoplásicos y su unión a tubulina. Estudio de la interacción proteína-ligando. USAL2005-002 (Universidad de Salamanca 2006-2007).

-Síntesis y evaluación de nuevos agentes antitumorales basados en combretastatinas y fenstatinas: vectorización y modificación del mecanismo de acción. SAF2008-0424. (Ministerio de Ciencia e Innovación. DGPTC-SGPI 2008-2011).

Su realización ha sido posible gracias a:

-Beca para la realización de tesis doctorales de la Fundación Ramón Areces (2005).

-Beca-contrato FPU del Ministerio de Educación y Ciencia. (2006-2007).

-Contrato de ayudante de la Universidad de Salamanca (2007-).

Una parte de los resultados presentados en esta memoria, han sido publicados en los siguientes artículos:

-“Synthesis and biological activity of naphthalene analogues of phenstatins: Naphthylphenstatins” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3417-3420.

-“Conformationally restricted macrocyclic analogues of combretastatins” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6316-6320.

-“Diarylmethyloxime and hydrazone derivatives with 5-indolyl moieties as potent inhibitors of tubulin polymerization” *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5952-5961.

-“Naphthylphenstatins as tubulin ligands: Synthesis and biological evaluation” *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8999-9008.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que con su ayuda y apoyo han contribuido a la realización de este trabajo:

A mis directores, Manolo y Rafa, por todo lo que me han enseñado profesional y personalmente. Por tener siempre la puerta de su despacho abierta, dispuestos a ayudar en todo lo necesario. Por su dedicación y paciencia, muchas gracias.

A los doctores Andrew Westwell y Andrea Brancale, por hacerme sentir una más durante mi estancia en Cardiff y por sus aportaciones a la última parte experimental de este trabajo.

Al Prof. Adam Nelson por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en la Universidad de Leeds.

A todos los profesores y compañeros del departamento, por hacer del laboratorio un agradable lugar de trabajo y orientarme cuando lo he necesitado.

A Consta y Rosa, por su inestimable ayuda y por hacer de su despacho nuestra segunda casa, sin olvidar el “momento pincho” de cada día, que hace que todos volvamos con una sonrisa al trabajo.

A todos mis amigos, Blanca, Elena, Lauri, Pilar, Manu, Andrés, Alex, Mieke, Diego, Raquel, Sonia, Pablo, Marta... por todos los buenos momentos compartidos durante estos años.

A mi familia, porque sin su apoyo, cariño y comprensión, no habría podido llegar hasta aquí. Y en especial, a mis padres y hermana, que han sufrido la distancia tanto como yo y a los que quiero y admiro tanto, que no puedo explicarlo con palabras.

A Fernando, por estar siempre ahí, tendiéndome su mano en los malos momentos y disfrutando juntos de los buenos. Por enseñarme a valorar y apreciar esas pequeñas cosas que, a veces, sin darnos cuenta, dejamos pasar.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN	21
I.1. REA DE COMBRETASTATINAS	27
I.1.A. <u>Modificaciones en el anillo A</u>	27
I.1.B. <u>Modificaciones en el anillo B</u>	28
I.1.C. <u>Modificaciones en el puente</u>	29
I.1.D. <u>Otras modificaciones</u>	30
I.2. REA DE FENSTATINAS	31
I.3. FARMACÓFORO Y ESTRUCTURA DE RAYOS X	32
II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	35
II.1. PUENTE OLEFÍNICO	37
II.2. ANILLO AR₁: TRIMETOXIFENILO	39
II.3. ANILLO AR₂: DERIVADO DE 5-INDOLILO	39
II.4. OBJETIVOS	40
III. MÉTODOS Y RESULTADOS	43
III.1. SÍNTESIS DE COMPUESTOS NO MACROCÍCLICOS	45
III.1.A. <u>Síntesis de isocombretastatinas</u>	47
III.1.A.1. Materiales de partida	48
<u>Obtención de los compuestos 11 y 12</u>	48
<u>Obtención de N-metil-5-bromo-1H-indol (10)</u>	49
III.1.A.2. Síntesis de diarilmetanoles	50
III.1.A.3. Síntesis de fenstatinas	53
III.1.A.4. Síntesis de isocombretastatinas	55
III.1.A.5. Modificaciones del anillo aromático Ar ₂	56
III.1.A.5.1. Modificaciones en los restos fenilo	56
<u>Reducciones de grupo nitro a amino</u>	56
<u>Desprotección de alcoholes</u>	58
III.1.A.5.2. Modificaciones en la posición 3 del indol	58
<u>Formilaciones</u>	59
<u>Reducciones del aldehído</u>	61
<u>Formación de oximas</u>	62
<u>Formación de hidrazonas</u>	62
<u>Tratamiento de oximas con anh. acético</u>	63
III.1.A.6. Modificación del puente	64

	<u>Reducción de la olefina del puente</u>	64
III.1.B.	<u>Síntesis de derivados de fenstatina con otros heterociclos</u>	67
III.1.B.1.	Materiales de partida	67
	<u>Obtención de benzimidazoles 14 y 15</u>	67
	<u>Obtención de 5-bromo-1,3-benzoxazol (17)</u>	68
III.1.B.2.	Síntesis de diarilmetanoles	69
	<u>Obtención de los compuestos 69 y 70</u>	69
	<u>Obtención del compuesto 73</u>	70
III.1.B.3.	Síntesis de fenstatinas	71
III.1.C.	<u>Síntesis de derivados de combretastatinas</u>	73
III.1.C.1.	Materiales de partida	74
	<u>Obtención de 1-metil-1H-indol-5-carbaldehído (4)</u>	74
	<u>Obtención de 1-etil-1H-indol-3,5-dicarbaldehído (3)</u>	74
	<u>Obtención de benzimidazol carbaldehídos 7 y 8</u>	75
III.1.C.2.	Síntesis de análogos de combretastatinas	76
	<u>Obtención del 1H-indol-3-carbaldehído 75</u>	77
	<u>Obtención de los derivados de benzimidazol 79 y 80</u>	78
	<u>Obtención del derivado de indol 76</u>	78
	<u>Obtención de los derivados 77 y 80</u>	79
III.2.	SÍNTESIS DE COMPUESTOS MACROCÍCLICOS	81
III.2.A.	<u>Intermedios monoarílicos y diarílicos</u>	85
III.2.B.	<u>Compuestos macrocíclicos</u>	87
III.3.	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE COMPUESTOS MACROCÍCLICOS	91
III.3.A.	<u>Olefinas</u>	91
III.3.B.	<u>Dioles y acetatos</u>	92
III.4.	ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE COMPUESTOS MACROCÍCLICOS	97
III.4.A.	<u>Olefinas</u>	99
III.4.A.1.	Análisis de conformaciones	99
	<u>Olefinas macrocíclica con dos restos fenilo. Equilibrio conformacional</u>	103
	<u>Olefinas macrocíclica con un resto fenilo simétrico y otro asimétrico. Equilibrio conformacional de OD, OE y OF</u>	106
	<u>Olefinas macrocíclica con un resto indolilo. Análisis conformacional de 84 y 87</u>	110
III.4.A.2.	Estudios de mecánica molecular y dinámica molecular de las olefinas 84 y 87	113
	<u>Mecánica molecular</u>	113

	<u>Dinámica molecular</u>	121
III.4.A.3.	Justificación de la apariencia de los espectros de RMN de las olefinas 84 y 87	135
III.4.B.	<u>Dioles y diacetatos</u>	139
III.4.B.1.	Análisis de conformaciones	139
	<u>Análisis de conformaciones de dioles con dos restos fenilo</u>	139
	<u>Análisis de conformaciones de dioles con un resto indolilo</u>	144
III.4.B.2.	Estudios de mecánica molecular y dinámica molecular de dioles y diacetatos	149
	<u>Mecánica molecular. Análisis de resultados</u>	155
	<u>Dinámica molecular</u>	163
III.4.B.3.	Justificación de la apariencia de los espectros de RMN de dioles y acetatos	173
	<u>Giro rápido del puente-Interconversión de conformaciones sinclinales.</u>	173
	<u>Giro lento del puente. Interconversiones lentas de conformaciones sinclinales.</u>	179
III.5.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	185
III.5.A.	<u>Actividad inhibidora de la polimerización de tubulina</u>	185
III.5.A.1.	Aislamiento de la proteína	186
III.5.A.2.	Ensayos de la actividad inhibitoria de polimerización de tubulina de los compuestos.	187
III.5.A.3.	Determinación de la IC ₅₀ de los compuestos seleccionados	189
III.5.B.	<u>Citotoxicidad</u>	191
III.5.C.	<u>Discusión de los resultados de actividad.</u>	193
III.5.C.1.	Aspectos generales.	193
III.5.C.2.	Consideraciones estructurales generales.	198
III.5.C.3.	Análisis de la contribución de elementos estructurales individuales.	203
IV.	PARTE EXPERIMENTAL	211
IV.1.	TÉCNICAS GENERALES	213
IV.2.	MÉTODOS GENERALES	217
IV.3.	SÍNTESIS DE COMPUESTOS NO MACROCÍCLICOS	223
IV.3.A.	<u>Materiales de partida.</u>	223
IV.3.B.	<u>Síntesis de fenstatinas e isocombretastatinas difenílicas</u>	233
IV.3.C.	<u>Síntesis de fenstatinas e isocombretastatinas con un resto indolilo.</u>	255
IV.3.D.	<u>Síntesis de fenstatinas con un heterociclo distinto de indol</u>	277
IV.3.E.	<u>Síntesis de combretastatinas.</u>	281

IV.4.	SÍNTESIS DE COMPUESTOS MACROCÍCLICOS	287
IV.4.A.	<u>Materiales de partida</u>	287
IV.4.B.	<u>Macrociclos</u>	291
IV.5.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	299
IV.5.A.	<u>Aislamiento de proteína microtubular</u>	299
IV.5.B.	<u>Determinación de la actividad inhibitoria de la polimerización de tubulina de los compuestos a una concentración</u>	301
IV.5.C.	<u>Determinación de la IC₅₀ de inhibición de polimerización de tubulina</u>	303
V. CONCLUSIONES		307
VI. TABLAS Y ESPECTROS		311

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anhidrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
Ar	Arilo
BI	Benzimidazol
BSA	Seroalbúmina bovina
Bu ₄ N ⁺ HSO ₄ ⁻	Hidrogenosulfato de tetrabutilamonio
<i>c</i>	Cuartete
CA-4	Combretastatina A4
CC	Cromatografía de columna
CCF	Cromatografía en capa fina
<i>d</i>	Doblete
<i>da</i>	Doblete ancho
DAMA-	<i>N</i> -diacetil- <i>N</i> -(2-mercaptoacetil)-
<i>dd</i>	Doble doblete
<i>ddd</i>	Doble doble doblete
DE	Disolución de extracción
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>dt</i>	Doble triplete
DT	Disolución de transporte
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(diaminoetiléter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
EM	Espectro de masas
EtBr	Bromuro de etilo
Et	Etilo
EtOH	Etanol
Fig.	Figura
GTP	Trifosfato de guanosina
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
Hz	Hercios
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IPT	Inhibición de la polimerización de tubulina
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	Grados Kelvin
Kcal	Kilocaloría
<i>m</i>	Multiplete
M ⁺	Ion molecular
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
Me	Metilo
MeI	Yoduro de metilo
mmol	Milimoles
MeO	Metoxilo.

MeOH	Metanol
MTP	Proteína microtubular
N ₂	Atmósfera de nitrógeno
<i>n</i> BuLi	<i>n</i> -butillitio
nm	Nanómetros
NMeIND	N-metil-5-indolilo
nOe	Efecto nuclear Overhauser
ns	Nanosegundos
OMe	Metoxilo
°C	Grado Celsius
P	Grupo fosfato
Pd/C	Paladio sobre carbono
PDC	Dicromato de piridinio
P.f.	Punto de fusión
Ph	Fenilo
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PPh ₃	Trifenilfosfina
ppm	Partes por millón
ps	Picosegundos
pyr	Piridina
REA	Relación estructura actividad
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
<i>s</i>	Singlete
<i>sa</i>	Singlete ancho
SC	Sinclinal
<i>t</i>	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDMS	<i>terc</i> Butildimetilsililo
TBDMSiCl	Cloruro de <i>terc</i> butildimetilsililo
TBDPS	<i>terc</i> Butildifenilsililo
TBDPSiCl	Cloruro de <i>terc</i> butildifenilsililo
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TM	3,4,5-Trimetoxifenilo
TMG	2,3,4-Trimetoxifenilo
t _R	Tiempo de retención
δ	Desplazamiento químico
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar

RESUMEN

Una de las estrategias empleadas en la lucha contra el cáncer es la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos capaces de inhibir la polimerización de tubulina y frenar, así, el crecimiento de las células cancerosas.

En nuestro grupo de investigación se ha optado por la síntesis y evaluación de nuevos agentes antimitóticos capaces de unirse a la tubulina en el sitio de la colchicina. Tomando como referencia la combretastatina A-4, durante los últimos años se han realizado modificaciones en ambos anillos aromáticos y en el puente.

La disposición *cisoid*e de los anillos aromáticos es una de las características estructurales clave para mantener la actividad antimitótica en estos compuestos. En este trabajo se han seguido dos estrategias diferentes para conseguir este objetivo:

- Sintetizar análogos macrocíclicos de combretastatina, que además restringen la movilidad de los anillos aromáticos.
- Obtener compuestos con estructura de 1,1-diarileno, isómeros de combretastatina que poseen la ventaja de no sufrir isomerizaciones *cis-trans*.

En todos estos compuestos se ha mantenido la presencia de un anillo de trimetoxifenilo, y se han introducido variaciones en el segundo anillo aromático. Principalmente se ha estudiado el efecto en la actividad que produce el empleo de restos *N*-metil-5-indolilo diferentemente sustituido en la posición C-3.

Finalmente, se ha evaluado, *in vitro*, la capacidad inhibitoria de polimerización de tubulina de todos los compuestos obtenidos y su actividad citotóxica frente a cuatro líneas celulares neoplásicas (HL-60, A-549, HeLa y HT-29).

ABSTRACT

The search and development of new inhibitors of tubulin polymerization drugs that stop cancer cell growing, is one of the present strategies to fight against the cancer.

Our research group has chosen for the synthesis and evaluation of new antimetabolic agents that are able to bind to the tubulin in the colchicine site. In the last few years, several modifications of both aromatic rings and the bridge have been performed using the combretastatin A-4 as a model.

Keeping the *cisoid* disposition of the rings is one of the structural keys to preserve the antimetabolic activity. This Ph. D. work has followed two different strategies to reach this objective:

- Synthesizing macrocyclic analogues of combretastatins, which also restrict the mobility of the aromatic rings.
- Obtaining compounds with 1,1-diarylethene structure. These isomers of combretastatins have the advantage of not suffering *cis-trans* isomerizations.

All these compounds have maintained a trimethoxyphenyl moiety and have different modifications on the other aromatic ring. Mainly, it has been studied the effect on the activity of several substitutions at the C-3 position of *N*-methyl-5-indolyl moiety.

Finally, all the synthesized compounds have been assayed *in vitro* to check their tubulin polymerization inhibitory activity and their cytotoxicity against four neoplastic cell lines (HL-60, A-549, HeLa and HT-29).

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto heterogéneo de enfermedades que puede afectar a todos los órganos del cuerpo y que consiste en la aparición de células cuyos mecanismos de proliferación se encuentran descontrolados. Estas células poseen una capacidad de división y crecimiento que supera los límites normales y pueden llegar a invadir los tejidos vecinos o incluso a diseminarse por todo el organismo a través del torrente sanguíneo o linfático (metástasis)¹.

En la actualidad, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, por detrás de las enfermedades cardiovasculares. En España, las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la primera causa de muerte entre las mujeres, mientras que en los hombres el cáncer las ha superado y es la primera causa de defunción².

Uno de los posibles tratamientos desarrollados para combatir el cáncer es la quimioterapia. Tomando como base que las células cancerosas presentan una elevada frecuencia de división celular, el desarrollo de numerosos fármacos se ha dirigido a la interrupción de la mitosis (fase del ciclo celular durante la cual se produce la división celular).

Nota: Las referencias bibliográficas se han incluido como notas a pie de página, no repitiendo las citas en cada capítulo (aunque sí en capítulos diferentes).

¹ www.cancer.gov/espanol, página web del Instituto Nacional del Cáncer.

² Datos del año 2006 recogidos en las encuestas realizadas por el INE y publicados en **2008**. Disponibles en <http://www.ine.es/prensa/np490.pdf>.

Los microtúbulos son un componente básico del citoesqueleto y juegan un papel importante durante la mitosis, además de participar en otros procesos como el transporte y los movimientos celulares. Los microtúbulos son cilindros huecos formados por 13 protofilamentos que, a su vez, están compuestos por heterodímeros de subunidades α/β de tubulina. Se puede decir que los microtúbulos presentan cierta polaridad y una dinámica inestable, ya que existe un equilibrio con dímeros que están constantemente adicionándose a uno de los extremos del microtúbulo (extremo +) y liberándose por el otro (extremo -) y se alternan procesos de polimerización de tubulina o crecimiento y despolimerización o acortamiento.³

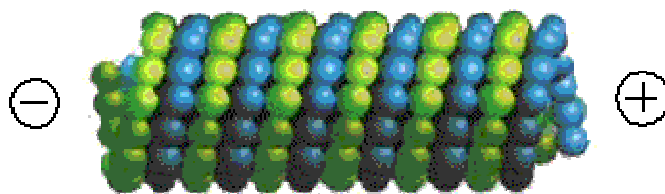


Figura 1. Representación gráfica de un microtúbulo con las subunidades α en verde y las β en azul.

La estructura tridimensional de los dímeros de tubulina es conocida y sobre ella se han identificado al menos cinco sitios de unión de ligandos: el sitio de unión del taxol, el sitio de unión de los alcaloides de la *vinca minor*, el sitio de unión de la colchicina y dos sitios de unión para GTP (uno intercambiable, sitio E, y otro no intercambiable, sitio N). Además cada mol de tubulina se encuentra unido a un mol de Mg^{2+} .

Mientras que el taxol ejerce su acción antimitótica a través de la estabilización de los microtúbulos, los compuestos que se unen al sitio de la vinca y de la colchicina actúan bloqueando la polimerización de la tubulina.⁴ En ambos casos se produce una alteración de la funcionalidad de los microtúbulos.

³ Hyams, J.; Lloyd, C. W. *Microtubules*; Wiley-Liss: New York, **1994**.

⁴a) Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, **2004**, *4*, 253-265. b) Li, Q.; Sham, H. L. Discovery and development of antimitotic agents that inhibit tubulin polymerisation for the treatment of cancer. *Expert Opin. Ther. Patents* **2002**, *12*, 1663-1702.

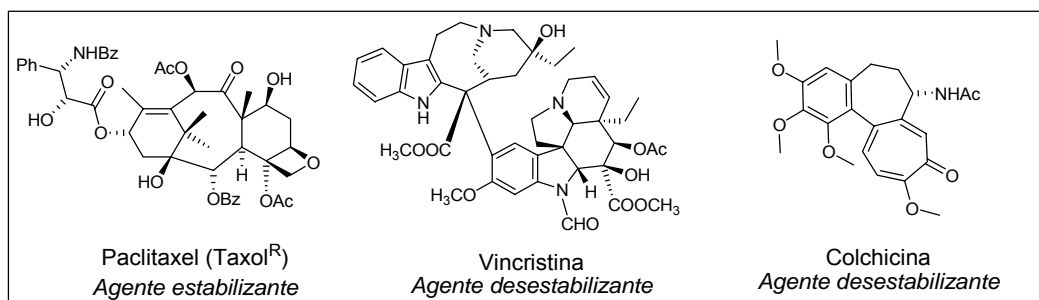


Figura 2. Estructuras de paclitaxel, vincristina y colchicina.

Existe una amplia variedad estructural entre los compuestos naturales y sintéticos que se unen a tubulina en el sitio de la colchicina.⁵ Además de ésta, se han descrito flavonoles, quinolonas, lignanos, combretastatinas, el 2-metoxiestradiol, bifenilos, chalconas, benzofenonas, etc. En general, estas familias de compuestos presentan dos anillos aromáticos no coplanares unidos por un puente de entre 0 y 4 átomos de carbono. Además, en muchos de los casos, uno de los anillo es un trimetoxifenilo.

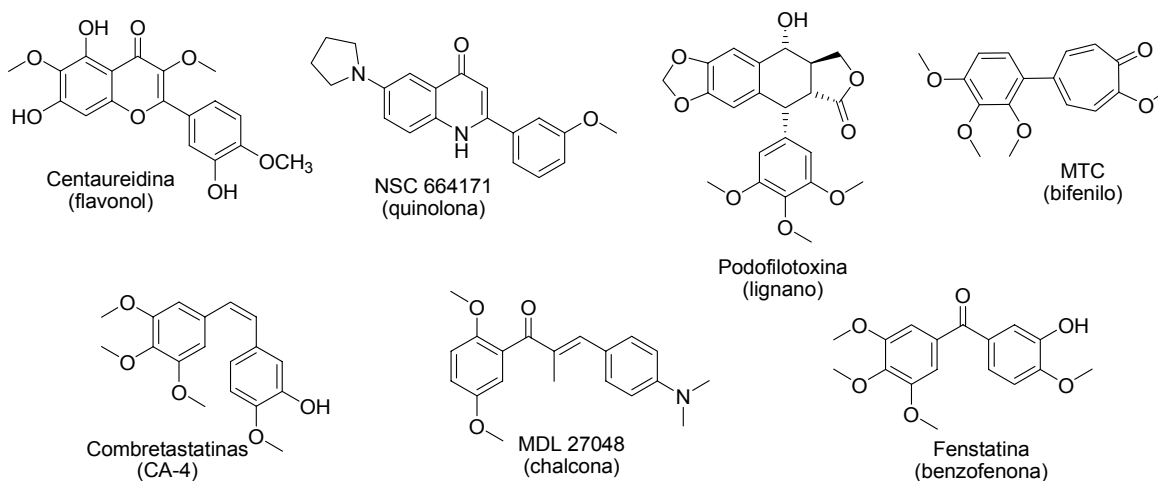


Figura 3. Compuestos que se unen al sitio de la colchicina.

⁵ Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259-296.

Nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio de algunas de estas familias (principalmente combretastatinas⁶ y fenstatinas⁷) y ha descrito algunos compuestos que inhiben la polimerización de tubulina en el rango submicromolar. A continuación se comentarán brevemente las relaciones estructura-actividad conocidas para estas familias.

⁶ Maya, A. B. S.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 556-568.

⁷ a) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Synthesis and biological activity of naphthalene analogues of phenstatins: naphthylphenstatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3417-3420. b) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Naphthylphenstatins as tubulin ligands: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8999-9008. c) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; López, J.L.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Diarylmethoxime and hydrazone derivatives with 5-indolyl moieties as potent inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5952-5961.

I.1. REA DE COMBRETASTATINAS.

Las combretastatinas son un grupo de productos naturales que fueron aislados por el grupo de Pettit de la corteza de *Combretum caffrum*,⁸ un árbol que se encuentra en las regiones tropicales de África e India. Entre ellas, el compuesto que ha presentado mayor citotoxicidad ha sido la combretastatina A-4, que ha sido tomada como molécula de referencia y cuya estructura puede servir como base para establecer las relaciones estructura actividad de esta familia de compuestos y los numerosos análogos sintéticos que han ido apareciendo.

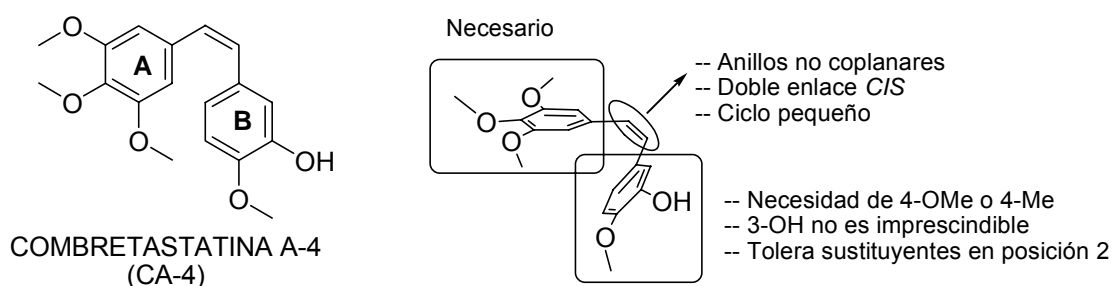


Figura 4. Estructura de la combretastatina A-4 a la izquierda y esquema de REA de combretastatinas.

I.1.A Modificaciones en el anillo A.

El anillo de trimetoxifenilo parece imprescindible para la citotoxicidad y la actividad inhibidora de polimerización de tubulina, ya que su sustitución conduce siempre a compuestos de menor potencia.⁹

⁸a) Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Singh, S. B. Antineoplastic agents. 122. Constituents of *Combretum caffrum*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 386-391.

⁹ Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; Nolan, S.; McGown, A. T. Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3033-3037.

I.1.B. Modificaciones en el anillo B.

El anillo de guayacol, por el contrario, permite mayor número de modificaciones.¹⁰ Mientras que el cambio del grupo metoxilo en *para* no conduce a compuestos más activos, las modificaciones en las posiciones 2 y 3 del anillo han llevado a la obtención de compuestos de igual o mayor potencia citotóxica. Así, la sustitución del grupo hidroxilo en *meta* por un bromo mantiene la potencia antimetabólica y la introducción de grupos amino la aumenta a la vez que mejora su solubilidad acuosa. Cabe destacar que los compuestos en los que el hidroxilo ha sido protegido con un grupo fosfato (CA-4P) o sustituido por un grupo amino (AVE-8062) se encuentran actualmente en ensayos clínicos.¹¹

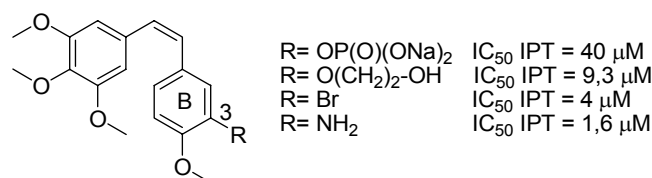


Figura 5. Modificaciones de la posición 3 del anillo B que mantienen la potencia como inhibidores de polimerización de tubulina

La sustitución del anillo B por anillos de menos de 6 miembros conlleva una pérdida de actividad. Sin embargo, su reemplazo por sistemas bicíclicos como naftaleno o indol no conlleva una importante disminución de la actividad.⁶

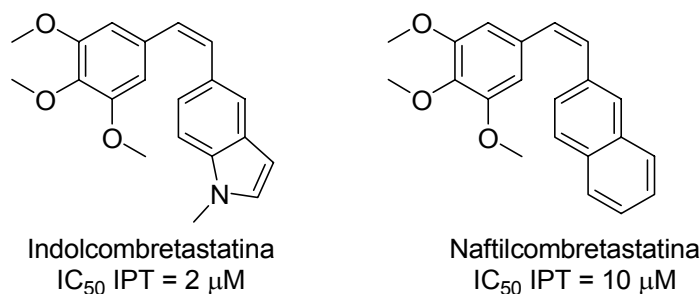


Figura 6. Sustitución del anillo de guayacol por sistemas bicíclicos.

¹⁰ a) Nam, N. H. Combretastatin A-4 analogues as antimetabolic antitumor agents. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1697-1722. b) Pinney, K. G.; Mejia, M. P.; Villalobos, V. M.; Rosenquist, B. E.; Pettit, G. R.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E. Synthesis and biological evaluation of aryl azide derivatives of combretastatin A-4 as molecular probes for tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2417-2425. c) Ohsumi, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Hatanaka, T.; Morinaga, Y.; Nihei, Y.; Ohishi, K.; Suga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T. Novel combretastatin analogues effective against murine solid tumors: design and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3022-3032.

¹¹ Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044.

I.1.C. Modificaciones en el puente.

Se ha visto que la distancia entre ambos anillos aromáticos es un factor determinante, ya que los compuestos con un puente formado por uno o dos carbonos presentan mayor potencia que los que poseen puentes de 3 o 4 átomos. Además, son los compuestos con disposición *cis* los que presentan mayor actividad antimitótica frente a sus isómeros *trans*, que en general son menos potentes. De esta manera, la reducción del doble enlace también reduce la actividad¹² al aumentar la flexibilidad del puente, permitiendo al compuesto adoptar conformaciones equivalentes a ambas olefinas.

Una estrategia para mantener la disposición *cis* de los anillos ha sido la síntesis de compuestos que presentan un ciclo en el puente. La introducción de heterociclos de cinco miembros en el puente ha sido estudiada por diversos grupos de investigación y ha conducido a la aparición de análogos de combretastatina capaces de mantener la inhibición de polimerización de tubulina.^{6,13} En el caso de la introducción de un dioxolano, se observa la importancia de la quiralidad, ya que solo el isómero *S,S* es capaz de mantener la actividad antimitótica.

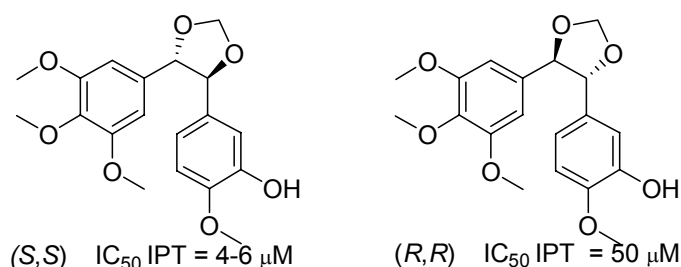


Figura 7. Valores de IPT de distintos dioxolanos quirales.

¹² Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Chakraborti, A. K.; Lin, C. M.; Hamel, E. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2579-2588.

¹³ a) Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Fujita, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Nihei, Y.; Suga, Y.; Morinaga, Y.; Akiyama, Y. Syntheses and antitumor activity of *cis*-restricted combretastatins: 5-membered heterocyclic analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3153-3158. b) Shirai, R.; Okabe, T.; Iwasaki, S. Synthesis of conformationally restricted combretastatins. *Heterocycles* **1997**, *46*, 145-148. c) Nam, N.; Kim, Y.; You, Y.; Hong, D.; Kim, H.; Ahn, B. Combretoxazolones: Synthesis, Cytotoxicity and Antitumor Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 3073-3076. d) Wang, L.; Woods, K. W.; Li, Q.; Barr, K. J.; McCroskey, R. W.; Hannick, S. M.; Gherke, L.; Credo, R. B.; Hui, Y.; Marsh, K.; Warner, R.; Lee, J. Y.; Mozing, N.; Frost, D.; Rosenberg, S. H.; Sham, H. L. Potent, orally active heterocycle-based Combretastatin A-4 analogues: Synthesis, structure-activity relationship, pharmacokinetics, and *in vivo* antitumor activity evaluation. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1697-1711.

I.1.D. Otras modificaciones.

Otra estrategia para mantener la disposición *cis* de las combretastatinas es la preparación de derivados macrocíclicos, conectando los anillos aromáticos a través de un puente adicional. Esta ciclación puede permitir incrementar la rigidez y la selectividad de compuestos bioactivos. Así, recientemente, en nuestro grupo de investigación se han sintetizado varias combretastatinas macrocíclicas que, si bien no mantienen la potencia de sus análogos no macrocíclicos, han aportado información acerca de las diferentes conformaciones que pueden adoptar las combretastatinas.¹⁴

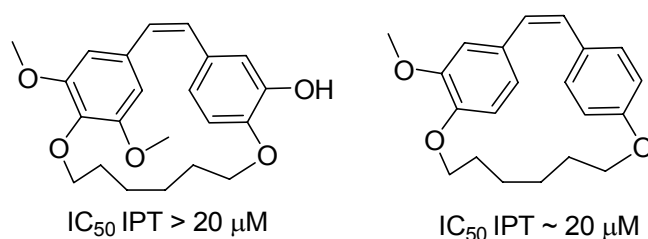


Figura 8. Análogos macrocíclicos de Combretastatina A-4.

¹⁴ a) Mateo, C.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Synthesis of a conformationally restricted polyoxygenated crownophane. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7055-7057. b) Mateo, C.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Stilbenophane Analogues of Deoxycombretastatin A-4. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6544-6547. c) Mateo, C.; López, V.; Medarde, M.; Peláez, R. Synthesis and conformational analysis of macrocyclic hydroxystilbenes linked between the *para-para* positions. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7246-7256. d) Mateo, C.; Álvarez, R.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Conformationally restricted macrocyclic analogues of combretastatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6316-6320.

I.2. REA DE FENSTATINAS.

Las fenstatinas son derivados de benzofenona sintetizados, inicialmente, para estudiar el efecto que producía, en la actividad citotóxica, la disminución en un átomo de la separación entre los anillos aromáticos de las combretastatinas.¹⁵ El desarrollo de esta familia de compuestos se ha visto impulsado por la aparición de derivados antimitóticos muy potentes que mejoran la solubilidad acuosa de las combretastatinas, uno de los principales problemas que plantea su uso clínico.

En general, las REA de fenstatinas siguen las mismas directrices que las de combretastatinas.^{15,16} La presencia de un anillo de trimetoxifenilo es necesaria para mantener la actividad, el puente carbonílico obliga a los anillos aromáticos a adoptar una disposición similar a los *Z* estilbenos y el anillo B es el que admite mayor número de modificaciones.

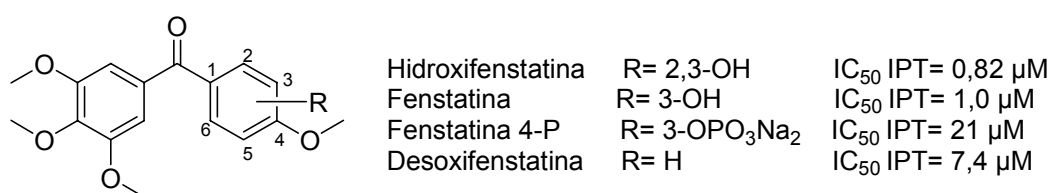


Figura 9. Estructura e inhibición de polimerización de tubulina de fenstatinas análogas a combretastatinas.

Sin embargo, existen modificaciones y determinados grupos funcionales que no ejercen la misma acción sobre la actividad de estas dos familias, como es el caso de la sustitución del anillo de guayacol por un resto indolilo unido por la posición 3¹⁷.

¹⁵ a) Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; He, H. M.; Lin, C. M.; Hamel, E. Synthesis and evaluation of analogues of (*Z*)-1-(4-methoxyphenyl)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethene as potential cytotoxic and antimitotic agents. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2293-2306. b) Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Michael R.; Hamel, E.; Pettit, R. K. Antineoplastic agents. 379. Synthesis of phenstatin phosphate. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1688-1695.

¹⁶ a) Pettit, G. R.; Grealish, M. P.; Herald, D. L.; Boyd, M. R.; Hamel, E. Pettit, R. K. Antineoplastic agents. 443. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor hydroxyphenstatin and its sodium diphosphate prodrug. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2731-2737. b) Liou, J. P.; Chang, C. W.; Song, J. S.; Yang, Y. N.; Yeh, C. F; Tseng, H. Y.; Lo, Y. K; Chang, Y. L.; Hsieh, H. P. Synthesis and structure-activity relationship of 2-aminobenzophenone derivatives as antimitotic agents. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2556-2562.

¹⁷ Liou, J. P.; Chang, Y. L.; Kuo, F. M.; Chang, C. W.; Tseng, H. Y.; Wang, C. C.; Yang, Y. N; Chang, J. Y; Lee, S. J; Hsieh, H. P. Concise synthesis and structure-activity relationships of combretastatin A-4 analogues, 1-aroylindoles and 3-aroylindoles, as novel classes of potent antitubulin agents. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4247-4257.

Otra característica que se ha observado para diversos análogos de fenstatina es la inexistencia de una correlación directa entre la potencia presentada en inhibición de polimerización de tubulina y citotoxicidad. De esta manera, las fenstatinas suelen mejorar la potencia en inhibición de polimerización de tubulina respecto a las combretastatinas y presentar una menor citotoxicidad.

I.3. FARMACÓFORO Y ESTRUCTURA DE RAYOS X DE LA TUBULINA.

Recientemente, a partir de una selección de compuestos que muestran la diversidad estructural de las moléculas que se unen al sitio de la colchicina, se ha propuesto un farmacóforo definido por siete posibles puntos de unión al sitio: tres aceptores de enlaces de hidrógeno (**A1**, **A2**, **A3**), un dador de enlaces de hidrógeno (**D1**), dos centros hidrofóbicos (**H1**, **H2**) y un grupo plano (**R1**).¹⁸

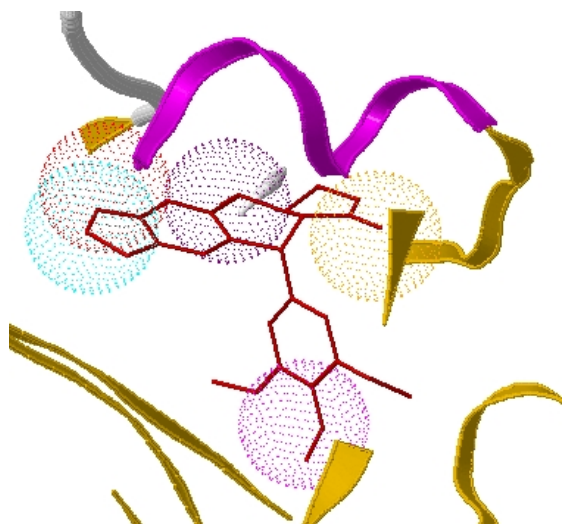


Figura 10a. Representación de la podofilotoxina en el sitio de la colchicina. Los puntos **A1**, **A2**, **A3**, **D1** y **H1** del farmacóforo están indicados por esferas punteadas del color correspondiente.

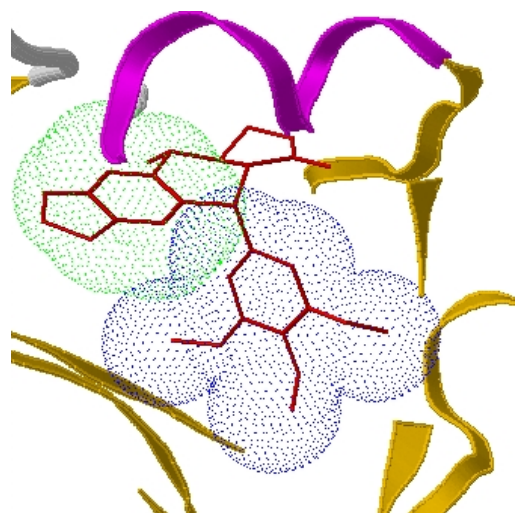


Figura 10b. Representación de la podofilotoxina en el sitio de la colchicina. Los puntos **H2** y **R1** del farmacóforo están indicados por esferas punteadas del color correspondiente.

¹⁸Nguyen, T. L.; McGrath, C.; Hermone, A. R.; Burnett, J. C.; Zaharevitz, D. W.; Day, B. W.; Wipf, P.; Hamel, E; Gussio, R. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6107-6116.

Según este modelo de farmacóforo, la mayor potencia que presentan algunas fenstatinas, respecto a sus correspondientes combretastatinas, se explicaría por la presencia de un punto farmacofórico extra (A3) que permitiría la posibilidad de establecer un enlace de hidrógeno adicional con la tubulina.

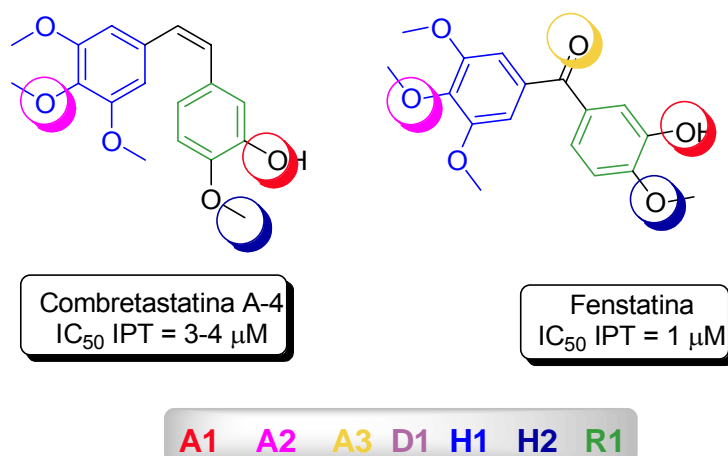


Figura 11. Representación de los puntos del farmacóforo presentes en la combretastatina A-4 y la fenstatina.

La descripción de este farmacóforo puede, por lo tanto, ayudar a predecir la capacidad para inhibir la polimerización de tubulina de los ligandos que se unen en el sitio de la colchicina. Sin embargo, como podremos comprobar en este trabajo doctoral, no todos los ligandos de la tubulina en el sitio de la colchicina están de acuerdo con este modelo.

Finalmente, cabe destacar las estructuras de rayos X de los complejos formados por α,β -tubulina con podofilotoxina y DAMA-colchicina, descritas recientemente por el grupo del profesor Ravelli.¹⁹ Aunque existe una gran variabilidad estructural para los ligandos del sitio de la colchicina, debido a la plasticidad de la proteína, se dispone de una herramienta con la que analizar los resultados de la actividad y racionalizar los efectos que diversas variaciones estructurales producen sobre la misma.

¹⁹ Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la síntesis y evaluación de nuevos agentes antimitóticos que combinen los siguientes elementos estructurales: un anillo de trimetoxifenilo, un anillo derivado de un resto 5-indolilo y un puente olefínico. Para ello, se han tomado como base los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en la síntesis de análogos de combretastatinas y fenstatinas.

La selección de dichos elementos estructurales y las diversas modificaciones de los mismos, se ha efectuado en base a los antecedentes existentes, según se discute a continuación:

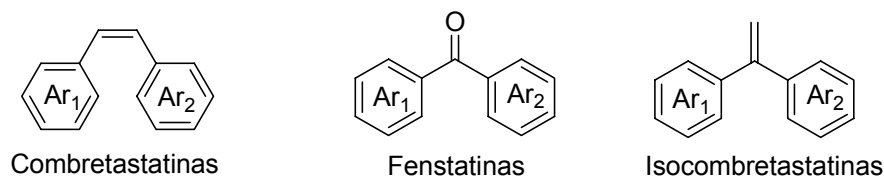
II.1. PUENTE OLEFÍNICO.

Estudios de REA, realizados anteriormente en combretastatinas y fenstatinas, muestran como éstas últimas poseen, en numerosas ocasiones, una mayor potencia en la inhibición de polimerización de tubulina respecto a las combretastatinas que poseen igual patrón de sustitución en los anillos aromáticos Ar₁ y Ar₂.²⁰

²⁰ a) Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; He, H. M.; Lin, C. M.; Hamel, E. Synthesis and evaluation of analogues of (Z)-1-(4-methoxyphenyl)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethene as potential cytotoxic and antimitotic agents. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2293-2306. b) Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Michael R.; Hamel, E.; Pettit, R. K. Antineoplastic agents. 379. Synthesis of phenstatin phosphate. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1688-1695. c) Pettit, G. R.; Grealish, M. P.; Herald, D. L.; Boyd, M. R.; Hamel, E. Pettit, R. K. Antineoplastic agents. 443. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor hydroxyphenstatin and its sodium diphosphate prodrug. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2731-2737. d) Liou, J. P.; Chang, C. W.; Song, J. S.; Yang, Y. N.; Yeh, C. F.; Tseng, H. Y.; Lo, Y. K.; Chang, Y. L.; Hsieh, H. P. Synthesis and structure-activity relationship of 2-aminobenzophenone derivatives as antimitotic agents. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2556-2562.

Este hecho concuerda con los datos aportados por el farmacóforo²¹ que ha sido descrito a partir de los estudios de docking realizados con diversos ligandos, estructuralmente diferentes, del sitio de la colchicina. De acuerdo con dicho estudio, el aumento de potencia de las fenstatinas vendría dado por la posibilidad de que se establezca un enlace de hidrógeno adicional, entre el oxígeno del puente y un grupo NH de los residuos β 248- β 249- β 250 de la cadena proteica.

En nuestro grupo de trabajo se han sintetizado recientemente compuestos en los que el oxígeno del puente es sustituido por un metileno.²² Estos compuestos, llamados isocombretastatinas por ser isómeros estructurales de las mismas, inhiben la polimerización de tubulina de forma más potente que sus fenstatinas correspondientes. Por ello, en este trabajo se ha planteado la síntesis y evaluación de un amplio número de compuestos con estructura de isocombretastatina (1,1-diariletenos).



²¹ T. L. Nguyen, C. McGrath, A. R. Hermone, J. C. Burnett, D. W. Zaharevitz, B. W. Day, P. Wipf, E. Hamel, R. Gussio. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6107-6116.

²² Álvarez, C. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, **2006**.

II.2. ANILLO AR₁: TRIMETOXIFENILO.

El anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo es prácticamente imprescindible, tanto en fenstatinas como en combretastatinas, ya que su sustitución suele conllevar una disminución en la actividad antimetabólica.²³ No obstante, se han sintetizado fenstatinas en las que su reemplazo por el anillo de 2,3,4-trimetoxifenilo confiere una mayor selectividad frente a determinadas líneas celulares cancerosas sensibles.²⁴ Así, se ha optado por emplear ambos en la síntesis de los compuestos de este trabajo.

II.3. ANILLO AR₂: DERIVADOS DE 5-INDOLILO.

El resto indol ha demostrado ser un buen sustituto del anillo de guayacol en combretastatinas y fenstatinas,²⁵ especialmente los derivados 5-indolilo *N*-sustituidos con un resto metilo.²⁶ En consecuencia, el sistema *N*-metil-5-indolilo ha sido tomado como base para realizar diversas modificaciones en el anillo Ar₂. Benzimidazoles y benzoxazoles pueden considerarse como aza- y oxa- análogos del indol, por lo que también se incluirán algunos representantes con estos sistemas.

²³ Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; Nolan S.; McGown, A. T. Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? *Org Biomol Chem.* **2003**, *1*, 3033–3037.

²⁴ a) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Synthesis and biological activity of naphthalene analogues of phenstatins: naphthylphenstatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3417-3420.

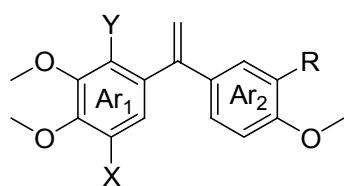
²⁵ Brancale, A.; Silvestri, R. Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 209-238.

²⁶ a) Maya, A. B.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 556–568. b) Liou, J. P.; Wu, C.Y.; Hsieh, H. P.; Chang, C. Y.; Chen, C. M.; Kuo, C. C.; Chang, J. Y. 4- and 5-Aroylindoles as novel classes of potent antitubulin agents. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4548-4552.

II.4. OBJETIVOS.

Una vez establecidos estos antecedentes, los objetivos concretos que se ha planteado alcanzar durante la realización de esta Tesis Doctoral se detallan a continuación:

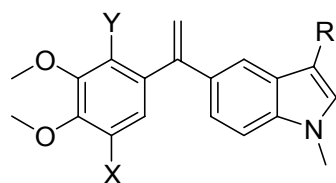
- Síntesis de una serie de isocombretastatinas que combinen un anillo de trimetoxifenilo y un resto fenílico con los mejores patrones de sustitución de combretastatinas y fenstatinas.



X=OMe, Y=H, R=H, OH, NO₂, NH₂.
X=H, Y=OMe, R=H, OH, NO₂, NH₂.

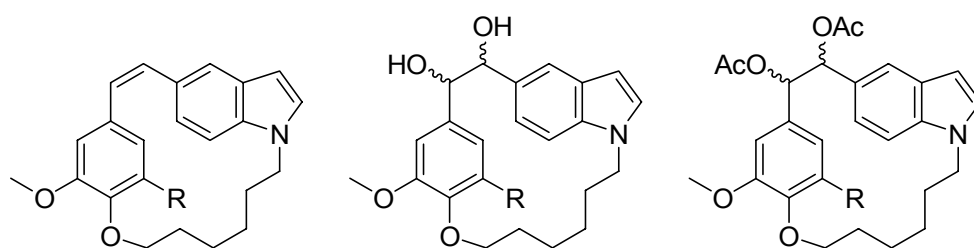
Este **primer objetivo** permitirá establecer el efecto que cada puente produce sobre la actividad, al comparar compuestos cuya estructura difenólica comparten las tres familias. Los resultados obtenidos servirán como referencia para los compuestos que adicionalmente presenten variaciones en los anillos aromáticos.

- Como **segundo objetivo**, se plantea la síntesis de isocombretastatinas que combinen los dos anillos trimetoxifenílicos con derivados indólicos que presenten modificaciones en la posición 3, ya que es la más accesible sintéticamente. De este modo, se introducirán diferentes grupos polares (aldehídos, alcoholes, oximas, hidrazonas...) que, previsiblemente, aumentarán la solubilidad acuosa de los compuestos y que podrían aumentar la interacción con la tubulina mediante la formación de algún enlace de hidrógeno adicional.



X=OMe, Y=H, R=H, CHO, CH₂OH, CH=NNH₂...
X=H, Y=OMe, R=H, CHO, CH₂OH, CH=NNH₂...

- Se han seleccionado algunas de las modificaciones del resto indolilo para realizar la síntesis de las correspondientes combretastatinas y fenstatinas, de manera que permita establecer comparaciones con las isocombretastatinas equivalentes. Adicionalmente, se plantea la síntesis de algunos derivados de fenstatina y combretastatina en los que el anillo Ar₂ sea reemplazado por un resto benzimidazolilo o benzoxazolilo, de manera que la modificación del carbono 3 del resto indolilo consista en su sustitución por un heteroátomo. La realización de estas dos partes completaría el **tercer objetivo**.
- Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se ha realizado la síntesis de análogos de combretastatina que presentan un espaciador entre los anillos aromáticos.²⁷ Estos compuestos macrocíclicos fuerzan la disposición *cisoid*e requerida de los dos anillos aromáticos y restringen notablemente su rotación, y por tanto, el número de conformaciones posibles. Se ha decidido continuar este estudio con la sustitución del anillo Ar₂ por un resto 5-indolilo y analizar el efecto sobre la potencia y la selectividad que estas restricciones confieren a estos agentes antimitóticos. De esta forma se ha definido el **cuarto objetivo** como la síntesis y el análisis conformacional de los análogos macrocíclicos que se muestran en la siguiente figura:



R=H, OMe

- El **quinto** y último **objetivo** consiste en la realización de los ensayos de inhibición de polimerización de tubulina de todos los compuestos sintetizados.

²⁷a) Mateo, C.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Synthesis of a conformationally restricted polyoxygenated crownophane. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7055-7057. b) Mateo, C.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Stilbenophane Analogues of Deoxycombretastatin A-4. *J. Org.Chem.* **2005**, *70*, 6544-6547. c) Mateo, C.; López, V.; Medarde, M.; Peláez, R. Synthesis and conformational analysis of macrocyclic hydroxystilbenes linked between the *para-para* positions. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7246-7256. d) Mateo, C.; Álvarez, R.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Conformationally restricted macrocyclic analogues of combretastatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6316-6320. e) Mateo, C. Tesis doctoral, Universidad de Salamanca, **2006**. f) Ramos, V. Tesis doctoral, Universidad de Salamanca, **2007**.

III. MÉTODOS Y RESULTADOS

III.1. SÍNTESIS DE COMPUESTOS NO MACROCÍCLICOS.

Como se ha descrito en el apartado de planteamiento y objetivos, en esta tesis se pretende sintetizar nuevos y potentes agentes antimitóticos relacionados con combretastatinas y fenstatinas, que incluyan un puente vinilénico y/o un resto 5-indolilo, además de un anillo de trimetoxifenilo.

Los compuestos no macrocíclicos obtenidos en este trabajo se pueden clasificar en función del puente que une los dos anillos aromáticos. De este modo, podemos diferenciar entre:

- A.** Isocombretastatinas o 1,1-diariletenos
- B.** Fenstatinas o 1,1-diarilmetanonas
- C.** Combretastatinas o 1,2-diariletenos

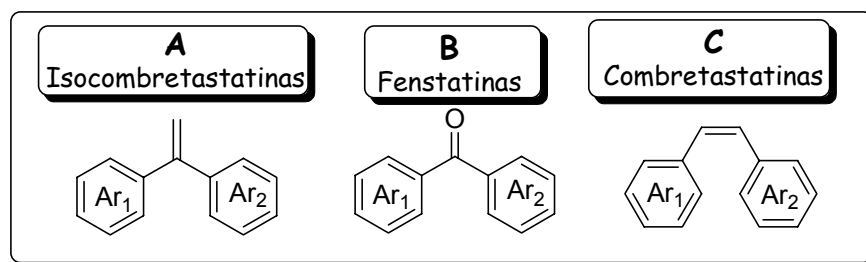
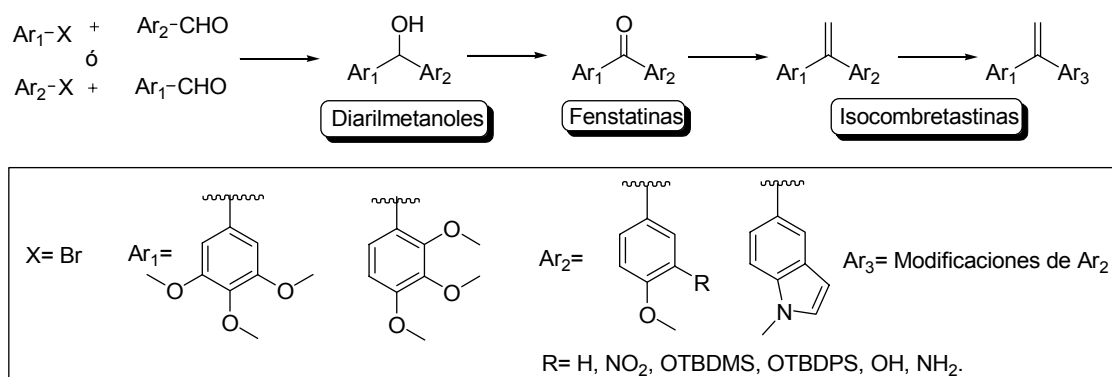


Figura 12. Clasificación de compuestos no macrocíclicos.

III.1.A. Síntesis de isocombretastatinas.

Los objetivos 1 y 2 de este trabajo comprenden la síntesis de dos familias de isocombretastatinas. Ambas poseen en todos sus compuestos un anillo de trimetoxifenilo, por las razones ya descritas. La estructura del anillo Ar_2 en la primera de las familias corresponde a derivados de fenilo que suelen aparecer frecuentemente en combretastatinas y análogos, mientras que en la segunda el anillo Ar_2 estará formado por diferentes restos *N*-metil-5-indolilo.

El planteamiento general para la síntesis de estos compuestos consiste en la obtención de los 1,1-diariletenos, con los anillos aromáticos seleccionados, a partir de las benzofenonas obtenidas por oxidación de los diarilmetanoles correspondientes. La ventaja de éste método, frente a otros como la acilación de Friedel-Crafts,²⁸ reside en la obtención de productos con regioquímica definida. Una vez formadas las isocombretastatinas base, se introducen las modificaciones del anillo aromático Ar_2 . El acoplamiento entre un derivado organometálico (arilmagnesio, arillitio) y un aldehído aromático ha sido el método elegido para la obtención de los derivados metanólicos.



Esquema 1. Esquema general de síntesis de isocombretastatinas.

²⁸ March, J. *Advanced Organic Chemistry*. J. Willey & Sons, Inc.; New York, **2001**, 1324.

III.1.A.1. Materiales de partida.

La mayoría de los materiales de partida utilizados para la síntesis de las isocombretastatinas son comerciales, a excepción de los que se describen a continuación.

Obtención de 4-metoxi-3-*terc*butildifenilsiloxibenzaldehído (**11**) y de 4-metoxi-3-*terc*butildimetilsiloxibenzaldehído (**12**).

La protección del grupo hidroxilo mediante la formación de un silil éter permite la realización de reacciones de acoplamiento, sin que se produzcan reacciones indeseadas entre el grupo fenólico ácido y el organometálico.

La reacción se produce mediante la adición de una base (triethylamina) que facilita la formación del anión ariloxi que, en presencia del cloroderivado de silicio correspondiente (TBDPSiCl o TBDMSiCl), da lugar a los silil éteres.²⁹

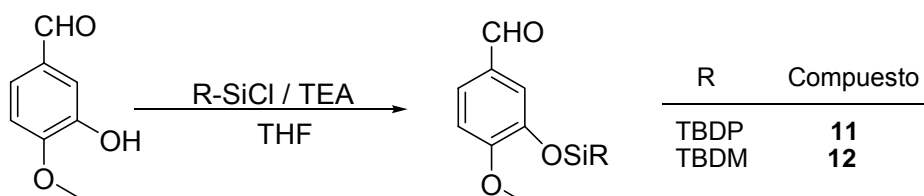


Figura 13. Obtención de silil éteres.

En los espectros de RMN ¹H del compuesto **11** se observa una señal que resuena como singlete a 1,12 ppm, correspondiente a los 9 H del grupo *terc*butilo, y dos señales en la zona aromática, que resuenan como multipletes a 7,38 y 7,68, que corresponden a los hidrógenos de los dos difenilos introducidos. Asimismo, en el espectro de RMN ¹H del compuesto **12** se observan 2 señales que resuenan como singlete a 0,17 ppm y 1,00 ppm, que se corresponden con los hidrógenos del dimetilsililo y del *terc*butilsililo respectivamente.

²⁹ Greene, T.; Wuts, P. Protective groups in organic synthesis. *J. Willey & Sons, Inc.*; New York **1999**.

Obtención de *N*-metil-5-bromo-1*H*-indol (**10**).

El carácter ácido del protón del NH del 5-bromoindol hace necesaria su protección con el fin de evitar reacciones indeseadas. En este trabajo se ha decidido introducir un grupo metilo sobre el N del indol, debido a que estudios previos en combretastatinas y fenstatinas muestran que la presencia del metilo no sólo no disminuye la inhibición de polimerización de tubulina de los compuestos sino que la aumenta.³⁰ Además, la presencia de un grupo *N*-alquilo mejora la manipulación y el rendimiento de las reacciones implicadas.

Debido al carácter ácido del indol, la alquilación se produce mediante la formación del anión por tratamiento con bases, en presencia de un catalizador de transferencia de fase, y la posterior adición del electrófilo requerido en esa posición.²⁸ Mediante este procedimiento se obtienen los productos de *N*-alquilación con buenos rendimientos.

En nuestro caso, la reacción se lleva a cabo utilizando hidróxido sódico como base e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio como catalizador de transferencia de fase, desprotonándose de esta forma el NH del indol. La posterior adición de yoduro de metilo da lugar al indol metilado con un 86% de rendimiento.

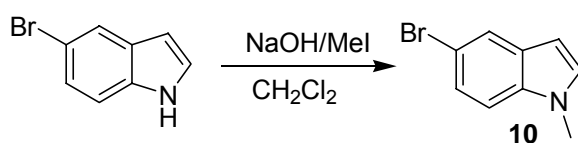


Figura 14. Obtención de 5-bromo-*N*-metil-1*H*-indol.

La señal característica del metilo del indol se observa a 3,77 ppm en el espectro de RMN ¹H y a 32,8 ppm en el espectro de RMN ¹³C.

³⁰ a) Maya, A. B.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 556–568. b) Liou, J. P.; Wu, C. Y.; Hsieh, H. P.; Chang, C. Y.; Chen, C. M.; Kuo, C. C.; Chang, J. Y. 4- and 5-Aroylindoles as novel classes of potent antitubulin agents. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4548–4552.

III.1.A.2. Síntesis de diarilmetanoles.

La preparación de los derivados alcohólicos se ha realizado siguiendo tres metodologías diferentes en función de los materiales de partida utilizados.

Para la síntesis de los compuestos difenólicos (Figuras 15a y 15b) se decidió formar el derivado organometálico del trimetoxifenilo, que se hizo reaccionar con los aldehídos cuyo patrón de sustitución correspondía con el anillo Ar_2 , ya que estos aldehídos eran más accesibles que los derivados bromados correspondientes.

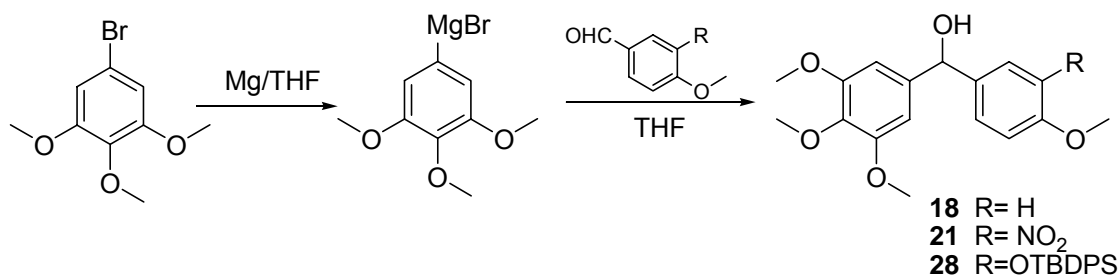


Figura 15a. Obtención de los compuestos **18**, **21** y **28**.

La síntesis de los derivados que contienen el resto 3,4,5-trimetoxifenilo se ha llevado a cabo mediante la formación del magnesiano por adición sobre el derivado bromado en posición 5, en THF a 0 °C, de magnesio y unas virutas de yodo. Una vez formado, el reactivo de Grignard se adiciona sobre una disolución en THF del aldehído correspondiente, dando lugar al alcohol (Figura 15a).

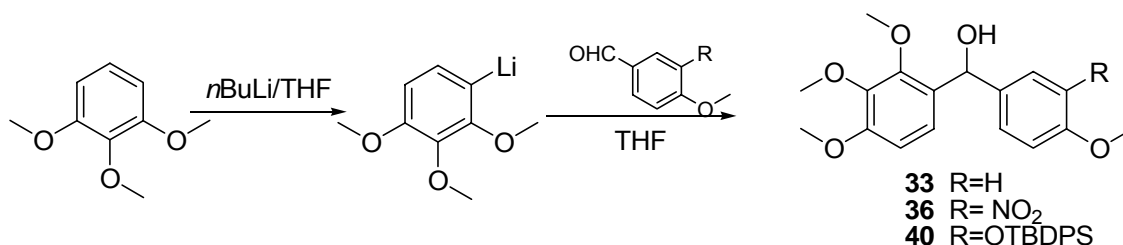


Figura 15b. Obtención de los compuestos **33**, **36** y **40**.

En el caso de los derivados con la agrupación 2,3,4-trimetoxifenilo, se decidió partir del 1,2,3-trimetoxibenceno (Figura 15b), ya que la adición de *n*BuLi genera el derivado organolitiado en la posición requerida, disminuyendo en un paso la síntesis (ya que no es necesaria la bromación).

La coordinación del litio con el oxígeno del metoxilo adyacente aumenta la estabilidad del derivado organometálico y, por tanto, favorece la litiación en posición *orto* de los metoxilos.³¹ De este modo, la adición de 0,9 mol de *n*BuLi por cada mol de 1,2,3-trimetoxibenceno disuelto en THF a 0 °C produce el derivado litiado, sobre el que se añade lentamente el aldehído correspondiente para la formación del alcohol.

La presencia de un exceso de 1,2,3-trimetoxibenceno no es un problema ya que, por su reducida polaridad, se elimina con facilidad por percolación sobre gel de sílice.

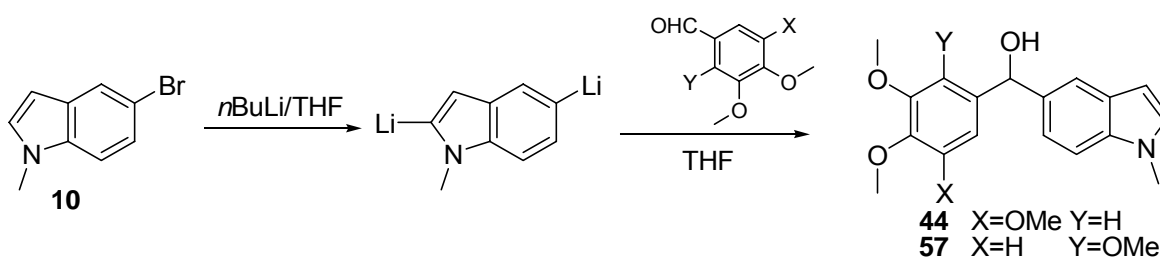


Figura 15c. Obtención de los compuestos **44** y **57**.

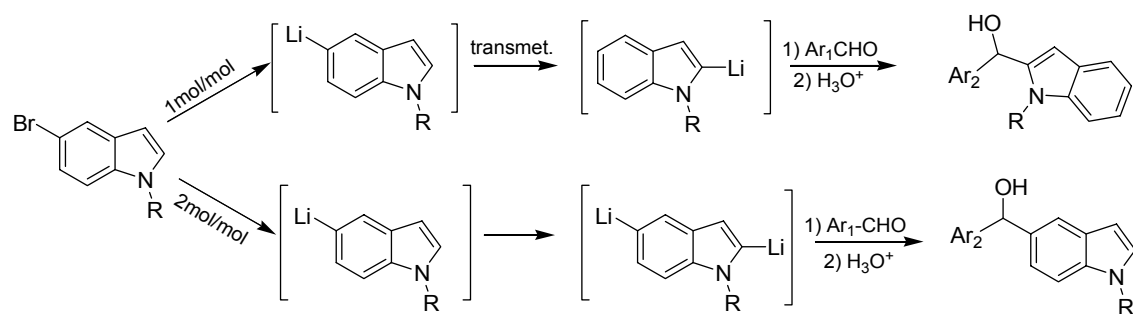
Para la obtención de los compuestos que contienen el resto *N*-metilindolilo (Figura 15c) se ha partido del bromoderivado de indol y del aldehído de los trimetoxifenilos, debido a que el coste de los materiales de partida es inferior y los rendimientos son parecidos a los que se obtienen a partir del *N*-metil-1*H*-indol-5-carbaldehído y el 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno o el 1,2,3-trimetoxibenceno.³² La síntesis se ha llevado a cabo mediante la formación del derivado organolítico a partir del derivado halogenado aromático por tratamiento con *n*BuLi en THF seco y a -78°C. A continuación se añade el aldehído correspondiente, disuelto también en THF, dando lugar al alcohol.^{32,33}

³¹ Rigolet, S.; McCort, I.; Le Merrer, Y. Efficient access to ATP mimics, potential FGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 8129-8132.

³² Álvarez, R. resultados sin publicar.

³³ Mahboobi, S.; Pongratz, H.; Hufsky, H.; Hockemeyer, J.; Frieser, M.; Lyssenko, A.; Paper, D. H.; Bürgermeister, J.; Böhmer, F. D.; Fiebig, H. H.; Burger, A. M.; Baasner, S.; Beckers, T. Synthetic 2-aryloindole derivatives as a new class of potent tubulin-inhibitory, antimetabolic agents. *J Med Chem*, **2001**, *44*, 4535-4553.

En trabajos anteriores,³⁴ se había observado que cuando se utilizan derivados de indol, se producen transmetalaciones entre los carbonos 2 y 5 (Esquema 2). La utilización de 2 equivalentes de *n*BuLi por cada uno de 5-bromoindol evita la aparición de derivados unidos a través de la posición 2 del indol. De esta manera se forma el dianión (en las posiciones 2 y 5) y el aldehído reacciona con la posición 5, que es la más reactiva, dando lugar al alcohol.



Esquema 2 - Formación de organolíticos en los derivados de indol.

En general, los rendimientos obtenidos son de buenos a muy buenos y adecuados para la preparación de los diarilmetanoles como materiales de partida de los restantes compuestos sintetizados en este trabajo. En la tabla siguiente se recogen los rendimientos obtenidos junto con la señal característica en el espectro de RMN ¹H del metino del puente, muy desapantallada por efecto de los anillos aromáticos contiguos.

<i>Producto</i>	<i>Ar₁</i>	<i>Ar₂</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>RMN ¹H CHOH (ppm)</i>
18	TM	4-MeO-Ph	91	5,7
21	TM	4-MeO-3-NO ₂ -Ph	-	5,7
28	TM	4-MeO-3-OTBDPS-Ph	94	5,4
33	TMG	4-MeO-Ph	>90	5,9
36	TMG	4-MeO-3-NO ₂ -Ph	32 (CC)	5,9
40	TMG	4-MeO-3-OTBDPS-Ph	74 (CC)	5,8
44	TM	NMeIND	50 (CC)	5,9
57	TMG	NMeIND	71 (CC)	6,1

Tabla 1. Rendimiento y señales características de los derivados metanólicos sintetizados.

³⁴ Álvarez, R. Trabajo de Grado. Universidad de Salamanca. 2005.

III.1.A.3. Síntesis de fenstatinas.

De acuerdo con el esquema planteado, el siguiente paso para la preparación de fenstatinas y compuestos derivados de las mismas, como isocombretastatinas, es la oxidación de los diarilmetanoles a diarilcetonas.

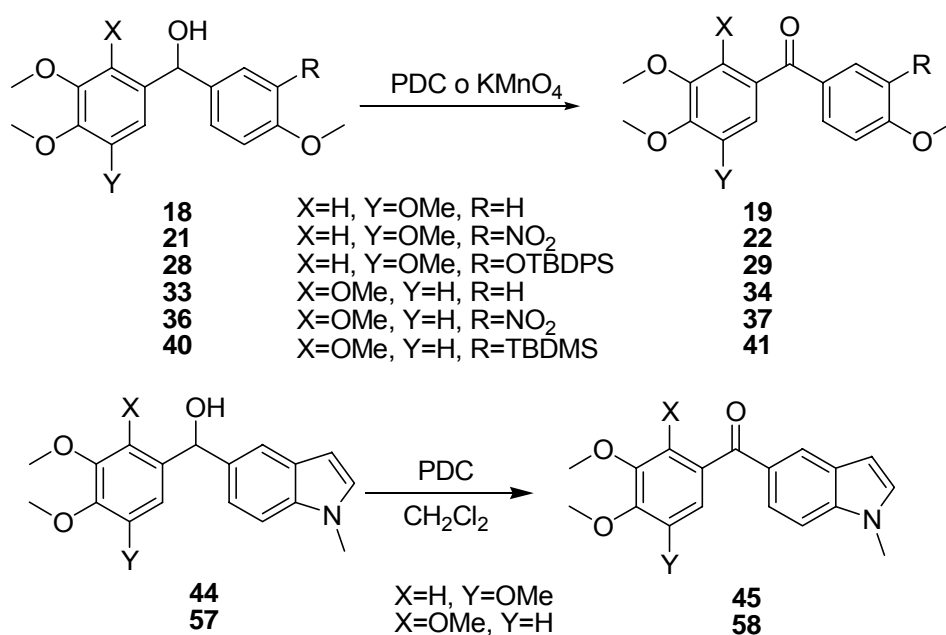


Figura 16. Obtención de los compuestos **19**, **22**, **29**, **34**, **37**, **41**, **45** y **58**.

El agente oxidante más utilizado para efectuar la oxidación de alcoholes a cetonas durante la síntesis de fenstatinas es el PDC.³⁵ Sin embargo, la utilización de este reactivo en la oxidación de los diarilmetanoles con el resto 2,3,4-trimetoxifenilo provocaba la rotura de la molécula, observándose la aparición de las señales características del 2,3,4-trimetoxibenzaldehído en el espectro de RMN ¹H. Por ello, se decidió utilizar para la oxidación de estos compuestos otras condiciones, ya utilizadas en nuestro grupo de investigación, en las que se emplea KMnO₄ como agente oxidante y bromuro de tetrabutilamonio como catalizador de transferencia de fase.³⁴

³⁵ Collins, J. C.; Hess W. W. Aldehydes from primary alcohols by oxidation with chromium trioxide: Heptanal. *Org. Synth.* **1988**, 644.

Sin embargo, debido a los bajos rendimientos obtenidos con KMnO_4 , se decidió volver a probar la oxidación con PDC en condiciones más suaves con los derivados con 2,3,4-trimetoxifenilo. De este modo se observa que la realización de la reacción a $0\text{ }^\circ\text{C}$, durante 4h y protegida de la luz, da como resultado la oxidación del alcohol, sin rotura de la molécula, con un rendimiento del 50%.

Producto	Ar ₁	Ar ₂	Condiciones	Rendimiento (%)	RMN ¹ H (ppm)
19	TM	4-MeO-Ph	PDC 24h	97	7,8
22	TM	4-MeO-3-NO ₂ -Ph	PDC 24h	36	8,3
29	TM	4-MeO-3-OTBDPS-Ph	PDC 24h	85	n.a *
34	TMG	4-MeO-Ph	PDC 4h	17	7,7
37	TMG	4-MeO-3-NO ₂ -Ph	KMnO ₄ 24h	39 (CC)	8,2
41	TMG	4-MeO-3-OTBDPS-Ph	KMnO ₄ 24h	92	n.a
45	TM	NMeIND	PDC 24h	65 (CC)	8,1
58	TMG	NMeIND	PDC 4h	47 (CC)	8,1

Tabla 2. Condiciones de oxidación y rendimientos obtenidos.

*n.a. = señales no asignadas.

En el análisis espectroscópico de RMN ¹H cabe destacar el desapantallamiento de la señal H-2 del resto fenilo y H-4 del resto indolilo, como se observa en la figura 7 y se recoge en la tabla 2.

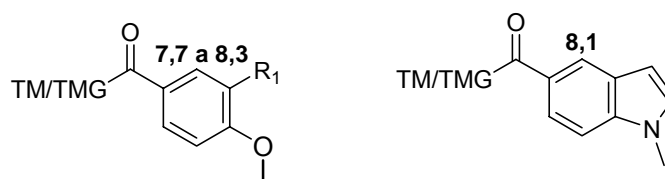


Figura 17.- Desapantallamiento de los protones aromáticos.

III.1.A.4. Síntesis de isocombretastatinas.

La metodología empleada para la síntesis de estos derivados es la reacción de Wittig,²⁸ utilizada habitualmente como primera opción para la formación de dobles enlaces carbono-carbono. La reacción entre un carbonilo y un iluro de fósforo suele producir rendimientos aceptables en presencia de grupos metoxilo, trialquilsiloxi y nitro como los presentes en los grupos arilo utilizados.

En nuestro caso, la reacción de Wittig ha sido realizada entre las diarilcetonas y ioduro de trifenilmetilfosfonio. La formación del iluro, utilizando como base *n*BuLi, se pone de manifiesto por una coloración anaranjada intensa de la reacción. Posteriormente, se añade la cetona disuelta en THF seco y se deja subir espontáneamente la temperatura hasta alcanzar temperatura ambiente.

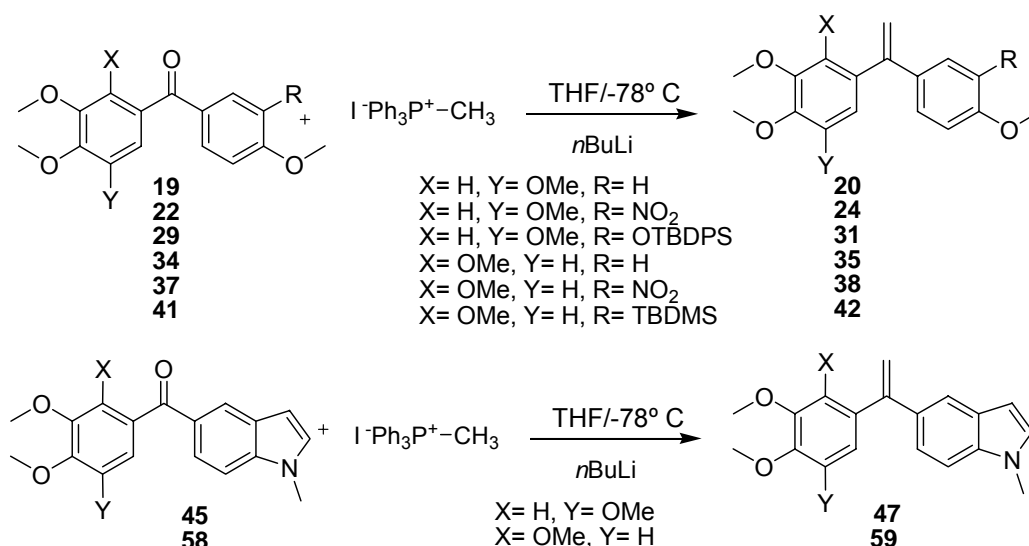


Figura 18. Obtención de las isocombretastatinas 20, 24, 31, 35, 38, 42, 47 y 59.

Las isocombretastatinas obtenidas por este método se purifican mediante cromatografía en columna obteniéndose rendimientos que oscilan entre el 20 y el 84%.

Las señales espectroscópicas características de estos compuestos son las correspondientes a los protones del CH₂ del puente y cabe destacar que, en los compuestos con el grupo 3,4,5-trimetoxifenilo, ambos protones presentan una diferencia de desplazamiento entre 0,05 y 0,07 ppm, mientras que en los compuestos que contienen el grupo 2,3,4-trimetoxifenilo, esta diferencia oscila entre 0,3 y 0,4 ppm.

Producto	Ar₁	Ar₂	Rendimiento (%)	RMN ¹H C=CH₂ (ppm)
20	TM	4-MeO-Ph	25 (CC)	5,32; 5,37
24	TM	4-MeO-3-NO ₂ -Ph	58 (CC)	5,27; 5,34
31	TM	4-MeO-3-OTBDPS-Ph	57 (CC)	5,10; 5,15
35	TMG	4-MeO-Ph	20 (CC)	5,18; 5,54
38	TMG	4-MeO-3-NO ₂ -Ph	27 (CC)	5,30; 5,58
42	TMG	4-MeO-3-OTBDPS-Ph	8 (CC)	5,17; 5,51
47	TM	NMeIND	84 (CC)	5,36; 5,43
59	TMG	NMeIND	66 (CC)	5,27; 5,66

Tabla 3. Rendimiento y señales características de las isocombretastatinas obtenidas.

III.1.A.5. Modificaciones del anillo aromático Ar₂.

Una vez obtenidas las estructuras base de fenstatina e isocombretastatina se procedió a realizar diversas modificaciones, con vista a la preparación de compuestos que ampliaran el conocimiento de las relaciones estructura-actividad de estos compuestos. El grupo trimetoxifenilo se ha mantenido en todos los casos ya que su presencia, aunque no absolutamente necesaria, siempre conduce a compuestos más potentes que su ausencia. Por tanto, las modificaciones posteriores se han centrado en el otro anillo aromático, afectando a la posición 3 del grupo fenilo (NO₂, OR) y a la posición 3 del sistema 5-indolilo (introducción de diversos sustituyentes).

III.1.A.5.1. Modificaciones en los restos fenilo.

Reducciones de grupo nitro a grupo amino.

Las reducciones de grupo nitro a grupo amino han sido ampliamente detalladas, principalmente para compuestos aromáticos. Entre todos los agentes reductores posibles, se recomienda la utilización de metales en medio ácido. En este trabajo se decidió usar Zinc en AcOH, obteniéndose de forma cuantitativa los productos **25** y **39**.

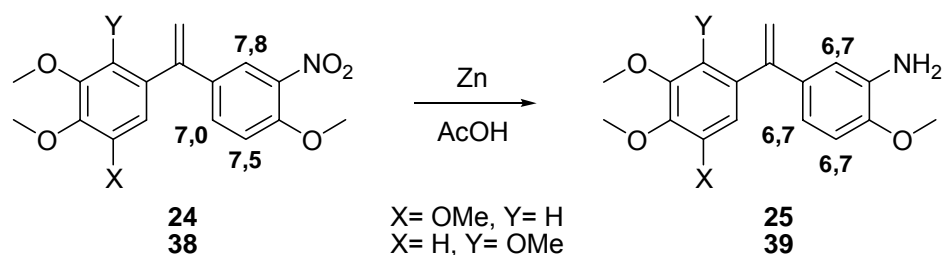


Figura 19. Señales espectroscópicas características de los productos oxidados y reducidos.

En el espectro de RMN ^1H se observa cómo las señales del anillo que soporta el grupo amino resuenan como una única señal a 6,7 ppm. El grupo amino también es detectado en IR por la aparición de una banda ancha en torno a 3300 cm^{-1} .

Adicionalmente, se realizó la reducción del compuesto **22** para obtener la aminofenstatina **23**, idéntica a la descrita en bibliografía,³⁶ con el fin de poder realizar los ensayos de actividad en las mismas condiciones utilizadas en este trabajo y efectuar las comparaciones oportunas. La utilización de Zinc en este caso provoca, simultáneamente, la reducción de la cetona del puente a su alcohol. Por ello, se decidió usar Fe en medio ácido, metodología habitual para la síntesis de este compuesto.³⁶

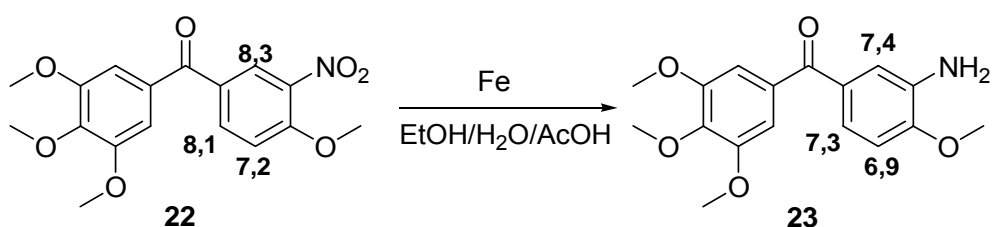


Figura 20. Señales características de la aminofenstatina.

Al igual que en los casos anteriores se produce un apantallamiento de las señales de protón del anillo Ar_2 .

³⁶ Liou, J. P.; Chang, J. Y.; Chang, C. W.; Chang, C. Y.; Mahindroo, N.; Kuo, F. M.; Hsiehet, H. P. Synthesis and structure-activity relationships of 3-aminobenzophenones as antimitotic agents. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2897-2905.

Desprotección de los sililéteres.

Para la obtención de los fenoles **32** y **43** se utilizó TBAF en THF.²⁹ Se puede comprobar la liberación del alcohol por la aparición de una banda a $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ en el espectro de IR.

Del mismo modo, por desprotección del compuesto **29** con TBAF se obtiene la fenstatina **30**,³⁷ que se utiliza como referencia en los ensayos de actividad.

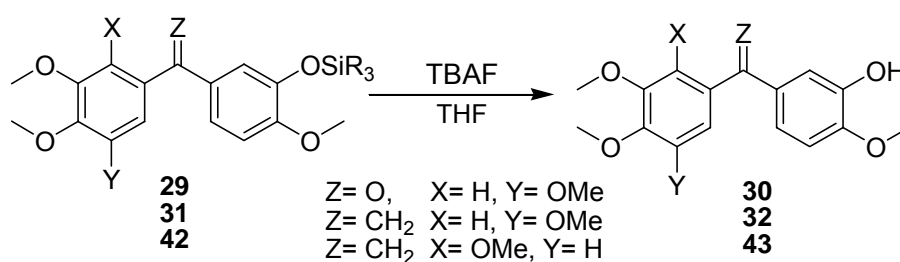


Figura 21. Obtención de los compuestos **30**, **32** y **43**.

III.1.A.5.2. Modificaciones en la posición 3 del indol.

El sistema indol parece muy adecuado para la preparación de antimicrobicos³⁸ cuando se combina con un sistema 3,4,5-trimetoxifenilo a través de diferentes puentes, según se ha comentado en el apartado de planteamiento y objetivos.

Además el sistema indol permite la introducción controlada de sustituyentes en diversas posiciones, obteniéndose derivados que pueden considerarse análogos rígidos en el anillo Ar₂ de fenstatinas. La posición 3 parece la más adecuada para la preparación de derivados de indol debido a su reactividad y a la localización de los sustituyentes en el sistema.

³⁷ Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Michael R.; Hamel, E.; Pettit, R. K. Antineoplastic agents. 379. Synthesis of phenstatin phosphate. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1688-1695.

³⁸ Brancale, A.; Silvestri, R. Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 209-238.

Las reacciones de sustitución electrofílica aromática, en general, y especialmente la formilación, que pueden servir de punto de partida para la preparación de diversos derivados, se producen con gran facilidad en dicha posición. Aunque otras sustituciones pueden ser de interés, el pequeño tamaño, reactividad y posibilidad de preparación de derivados nitrogenados, hicieron aconsejable preparar los derivados formilados en este primer estudio.

En lo referente a la localización del sustituyente, la posición 3 viene a ser equiparable a la posición ocupada por los sustituyentes en el O o el N en 3 de fenstatina y aminofenstatina.

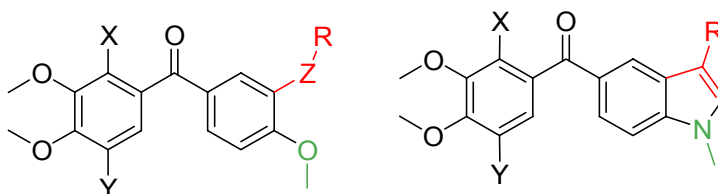


Figura 22. Comparación de fenstatinas clásicas e indolofenstatinas.

Esta posición ha sido utilizada en agentes antimicrobóticos que se unen al sitio de la colchicina para incrementar las interacciones con el mismo y para preparar profármacos de interés como el fosfato de la CA-4 que se encuentra en ensayos clínicos.³⁹

Formilaciones.

Una vez sintetizadas las isocombretastatinas con el resto *N*-metilindolilo, se procedió a realizar las modificaciones en la posición 3 del mismo, que se inician con una reacción de formilación de Vilsmeier-Haack. Los compuestos obtenidos con el grupo formilo serán los materiales de partida para el resto de las modificaciones.

La reacción se lleva a cabo en dimetilformamida, que en presencia de oxiclورو de fósforo (POCl_3) produce un catión iminio. Este catión es el encargado de realizar la sustitución electrofílica aromática generando un intermedio que se hidroliza para dar el aldehído aromático.⁴⁰

³⁹ Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliari, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044.

⁴⁰ Campaigne, E.; Archer, W. L. Formylation of dimethylaniline. *Org. Syn. Coll.* **1963**, *4*, 331.

La formilación en la posición 3 del indol se ha realizado usando un exceso de DMF y 1 mmol de POCl_3 por cada mmol de compuesto de partida. El catión iminio se genera a 0°C y posteriormente se calienta la reacción durante 2 horas, tras las cuales se hidroliza el intermedio formado con una solución acuosa de acetato sódico. En estas condiciones se obtuvieron, además de los productos esperados, otros derivados doblemente formilados. La aparición de estos derivados disminuye si se reduce el tiempo de reacción.

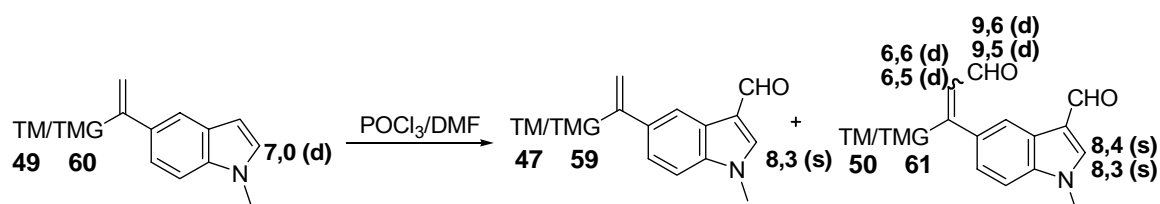


Figura 23. Señales características de los monoaldehídos y los dialdehídos.

En el espectro de RMN ^1H de los compuestos formulados en 3 es característico el desapantallamiento que sufre la señal del hidrógeno de la posición 2 del indol: Su desplazamiento químico en RMN ^1H se diferencia en más de 1 ppm del de los compuestos de partida y pasa a resonar como singlete en vez de como doblete.

En el espectro de RMN ^{13}C de los derivados doblemente formilados se observa la desaparición de la señal del metileno olefínico del puente. En el espectro de RMN ^1H se observa que la desaparición de estos protones está acompañada por la aparición de dos señales que resuenan como dobletes con una constante de acoplamiento de 8 Hz, una a 9,6 ppm y otra 6,6 ppm. Estos cambios se atribuyen a la formilación del grupo vinilideno ($>\text{C}=\text{CH}_2$), que se transforma en un aldehído conjugado ($>\text{C}=\text{CH}-\text{CHO}$). La formación de dos derivados de doble formilación se explica por la existencia de los isómeros *Z* y *E* como resultado de la formilación del puente. Los isómeros *Z* y *E* no se separan por cromatografía en columna, pero fue posible purificar por cristalización el isómero *Z* del derivado que contiene el 3,4,5-trimetoxifenilo (**50Z**), cuya estereoquímica se asignó mediante espectros de diferencia de nOe.

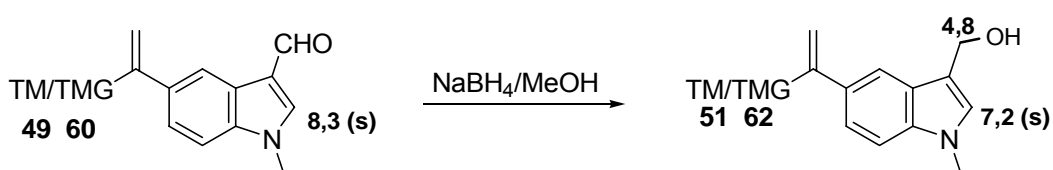
Adicionalmente, se realizó la formilación de la fenstatina **45** usando la misma metodología, para comprobar si la formilación del resto indolilo induce el mismo efecto antimitótico en fenstatinas que en isocombretastatinas.

Figura 24. Obtención del compuesto **46**.

Como se observa en la figura, en este caso, el análisis de RMN ^1H refleja un desapantallamiento de 0,6 ppm de las señales del protón H-2 y del protón H-4 del resto indolilo.

Reducciones de los aldehídos.

Debido a que las reducciones de compuestos carbonílicos con hidruros de metal suelen dar sus correspondientes alcoholes con buenos rendimientos, se decidió preparar los 3-indolilmetanoles en primer lugar. En este caso se optó por emplear borohidruro de sodio que, aunque menos reactivo que otros hidruros (como por ejemplo el hidruro de aluminio y litio), presenta mayor estabilidad al aire y a la humedad. De este modo, se realizó la reducción en MeOH usando un exceso de NaBH_4 .

Figura 25. Obtención de los compuestos **51** y **62**.

En el análisis espectroscópico de RMN ^1H se observa la aparición de una señal que resuena como singlete a 4,8 ppm, correspondiente al metileno hidroxilado y el apantallamiento de la señal del protón H-2 del resto indolilo.

Formación de oximas.

Las oximas son también derivados de interés debido a que aumentan la posibilidad de establecer enlaces de hidrógeno, de interaccionar con la proteína y de preparar derivados como las acetoximas. Las oximas se han preparado de forma satisfactoria en la obtención de derivados de fenstatinas, mediante la introducción de dicha agrupación en el puente carbonílico,⁴¹ dando lugar a compuestos muy potentes, con elevados rendimientos. En este caso, las oximas se han obtenido por reacción de los aldehídos con clorhidrato de hidroxilamina usando como disolvente metanol y piridina. De este modo, se obtiene las oximas como una mezcla de los isómeros *Z* y *E*, con alto rendimiento y sin necesidad de purificación por cromatografía en columna. La separación de los isómeros fue posible mediante cromatografía en columna. Sin embargo, la identificación de cada uno de ellos no pudo completarse ya que en disolución se isomerizan rápidamente para dar una mezcla 1:1 idéntica a la obtenida directamente como crudo de reacción.

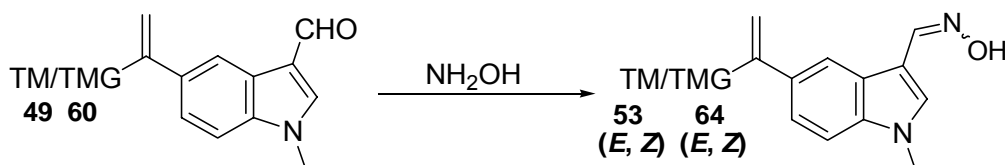


Figura 26. Obtención de los compuestos **53** y **64**.

Formación de hidrazonas.

Debido a las semejanzas y diferencias existentes entre el grupo oxima e hidrazona, la preparación de estas últimas es una prolongación aconsejable durante un estudio inicial sobre las relaciones estructura actividad de estos compuestos.

⁴¹ a) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M., Naphthylphenstatins as tubulin ligands: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8999-9008.

b) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Lopez, J. L.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M., Diarylmethyloxime and hydrazone derivatives with 5-indolyl moieties as potent inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5952-5961.

La preparación de las hidrazonas se ha realizado a partir de los aldehídos por reacción con hidracina en metanol con unas gotas de ácido acético. Durante la reacción se produce, además, la reducción del doble enlace del puente. En el caso de los compuestos con un resto 2,3,4-trimetoxifenilo, éstos son los únicos productos obtenidos. Las hidrazonas se han obtenido con buenos rendimientos como mezcla de los isómeros *Z* y *E*, los cuales no fue posible separar mediante cromatografía de columna en gel de sílice.

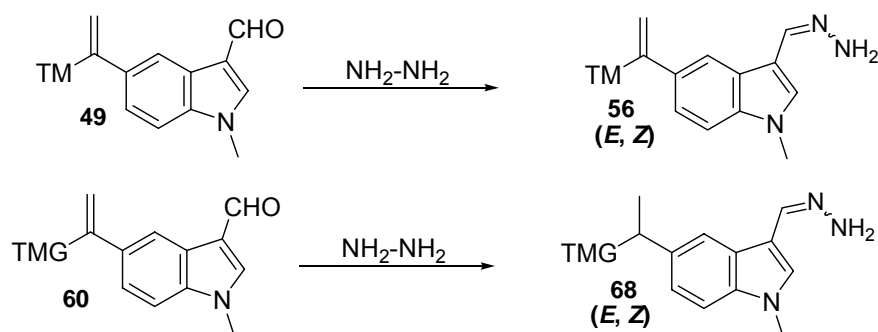


Figura 27. Obtención de los compuestos **56** y **68**.

Tratamiento de las oximas con anhídrido acético.

Con el fin de obtener las acetoximas, se realizó el tratamiento de las oximas con anhídrido acético y piridina resultando en las dos series un producto complejo. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía de columna obteniéndose en la serie con 3,4,5-trimetoxifenilo el carbonitrilo (**54**) con un 30-35% de rendimiento y una mezcla de los isómeros **55** *Z* y *E* de las acetoximas en un 20 % de rendimiento. En el derivado que contiene 2,3,4 trimetoxifenilo, adicionalmente se obtuvo un 7% del compuesto **66** (fenstatina con nitrilo en 3 del indol) probablemente debido a la existencia de restos de la cetona correspondiente (**58**) durante la reacción de acetilación.

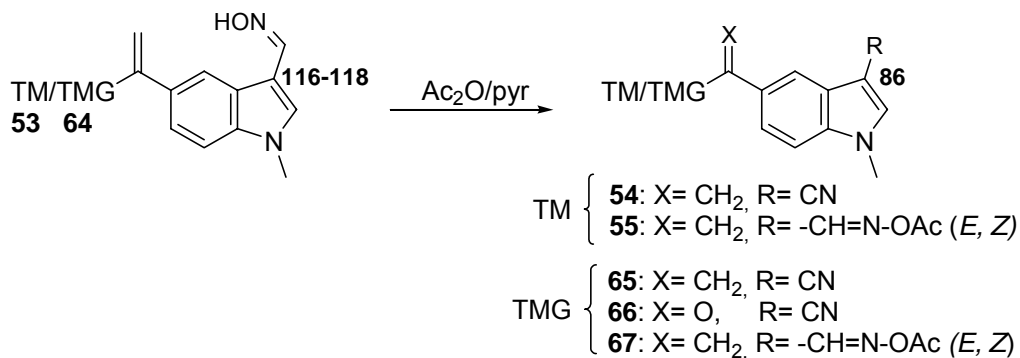


Figura 28. Obtención de los compuestos **54**, **55**, **65**, **66** y **67**.

En el espectro de RMN ^{13}C destaca el apantallamiento que sufre el carbono del sustituyente en posición 3 que pasa de resonar a 117 ppm en la oxima a hacerlo a 86 ppm en el nitrilo (Figura 28). Los acetatos obtenidos no pudieron ser caracterizados ya que se degradan rápidamente en disolución.

III.1.A.6. Modificación del puente.

La introducción de sustituyentes en el puente, a no ser que sean de pequeño tamaño, producen efectos negativos sobre la actividad. Por otra parte, la hidrogenación de las combretastatinas, que les hace perder rigidez y cambiar sus disposiciones preferidas, produce una disminución notable de la citotoxicidad y de la inhibición de polimerización de tubulina. En las isocombretastatinas, la hidrogenación del puente sólo produce una pequeña alteración en la geometría de la molécula, no modifica los grados de libertad de la misma y, prácticamente, no afecta al tamaño. Por lo tanto, la preparación de derivados hidrogenados de isocombretastatinas (1,1-diariletanos) parece una modificación útil para añadir información sobre el efecto de las modificaciones del puente de las fenstatinas.

Reducción de la olefina del puente.

Así pues, con el fin de comprobar si la hibridación sp^2 del carbono del puente es indispensable para la actividad antimitótica (al igual que ocurre en los derivados de fenstatinas en los que la reducción del carbonilo del puente conlleva una disminución de la potencia) o si, por el contrario, podría sustituirse por un carbono sp^3 , se decidió realizar la reducción de algunas de las isocombretastatinas sintetizadas.

Las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de hidrógeno utilizando como catalizador paladio sobre carbono y etanol como disolvente.

Para la hidrogenación del puente se seleccionaron cuatro isocombretastatinas en las que Ar₁ corresponde a un resto 3,4,5-trimetoxifenilo (de las cuales, dos poseen un fenilo sustituido como Ar₂ y dos un resto 5-indolilo) y una en la que los dos anillos aromáticos los forman el resto 2,3,4,-trimetoxifenilo y el resto *N*-metil-5-indolilo.

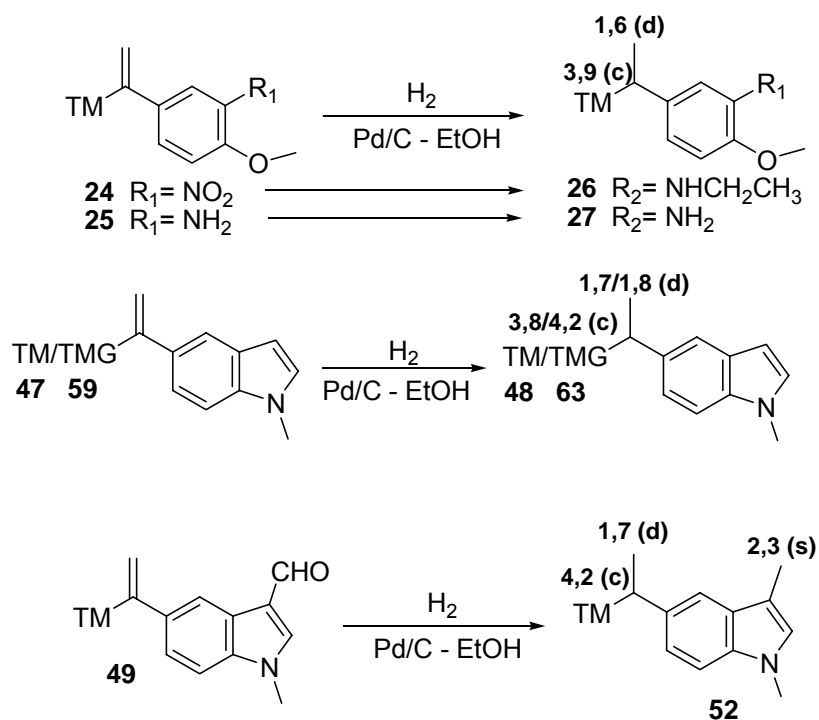


Figura 29. Obtención de los compuestos **26**, **27**, **48**, **52** y **63**.

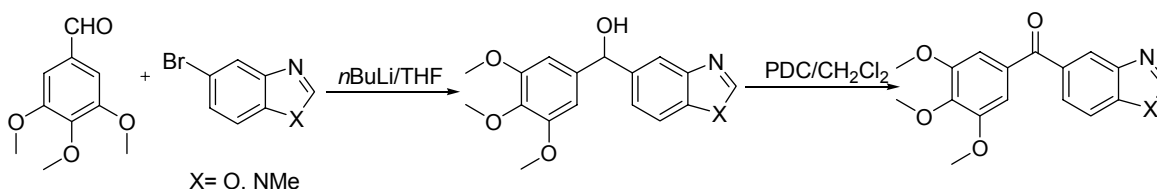
Son características de estos compuestos las señales de RMN ¹H del grupo CHCH₃. El H del carbono bisbencílico resuena como cuartete en torno a 4 ppm y el metilo resuena como doblete a 1,6-1,8 ppm.

Cuando se hidrogena la isocombretastatina formilada, también se reduce el aldehído hasta metilo. Así, desaparece la señal de RMN ¹H característica a 10 ppm del protón del aldehído y se observa un singlete a 2,3 ppm correspondiente al metilo.

En el caso de la isocombretastatina que posee un grupo nitro, éste también se reduce en las condiciones de reacción y, adicionalmente, se introduce un etilo sobre el nitrógeno. La formación de este compuesto (**26**) se observa claramente en el espectro de masas y en los espectros de RMN ¹H y de RMN ¹³C.

III.1.B. Síntesis de derivados de fenstatina con otros heterociclos.

Dentro de los objetivos de este trabajo, se planteó la sustitución del anillo 5-indolilo por otros heterociclos. Debido a los buenos resultados obtenidos con los derivados indólicos, se seleccionaron anillos benzofusionados, de estructura similar al indol, que incorporaran un heteroátomo adicional en posición 3. De este modo, se decidió sintetizar las fenstatinas que combinan un resto 3,4,5-trimetoxifenilo y un resto 1,3-benzoxazolilo o 1*H*-benzimidazolilo utilizando la metodología descrita en el apartado anterior.



Esquema 3. Procedimiento de síntesis de fenstatinas con benzimidazol y benzoxazol.

III.1.B.1. Materiales de partida.

Los derivados bromados de los heterociclos seleccionados no son comerciales, por lo que se sintetizaron previamente a la reacción de acoplamiento con 3,4,5-trimetoxibenzaldehído.

Obtención de 5-bromo-1-metil-1*H*-benzimidazol (14) y 6-bromo-1-metil-1*H*-benzimidazol (15).

A partir de 4-bromobenceno-1,2-diamina, por tratamiento con ortoformiato de trimetilo en medio ácido,⁴² se obtiene de forma cuantitativa el 5-bromobenzimidazol. En el espectro RMN ¹H se observa la aparición de la señal correspondiente al H-2 que resuena como singlete a 7,99 ppm.

⁴² Roberts, R. M.; Vogt, P. J. *N*-Ethyl-*p*-chloroaniline. *Org. Syn. Coll.* **1963**, *4*, 420-422.

Una vez obtenido el benzimidazol bromado, se procedió a la alquilación del NH, tanto para evitar la presencia de hidrógenos ácidos durante la reacción de acoplamiento como para mantener el grupo metilo presente en indolil-fenstatinas potentes obtenidas con anterioridad. En este caso se obtiene la mezcla de dos isómeros (**14** y **15**) debido a la deslocalización de la carga negativa entre los dos nitrógenos, que se produce cuando tratamos el benzimidazol-5-carbaldehído con una base (NaOH). Tras cromatografía en columna de gel de sílice no fue posible la separación de los dos isómeros, por lo que se utilizó la mezcla 1:1 (obtenida con un rendimiento del 53%) en el acoplamiento con 3,4,5-trimetoxibenzaldehído.

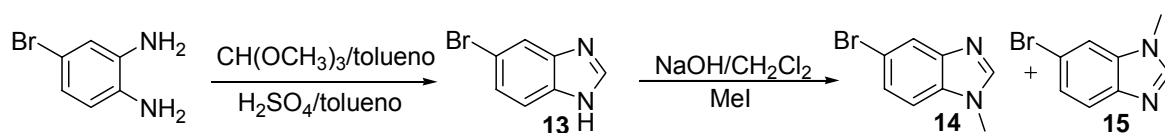


Figura 30. Procedimiento de obtención de los benzimidazoles metilados.

Obtención de 5-bromo-1,3-benzoxazol (**17**).

La preparación del 5-bromo-1,3-benzoxazol se efectúa por el mismo procedimiento anterior, utilizando como material de partida el aminofenol obtenido mediante la reducción de 4-bromo-2-nitrofenol con cloruro de estaño. El producto se hizo reaccionar con ortoformiato de trimetilo en medio ácido para obtener 5-bromo-1,3-benzoxazol, que se caracteriza por la aparición de la señal del protón H-2 en el espectro RMN ^1H a 8,05 ppm. El rendimiento obtenido tras los dos pasos es del 32%.

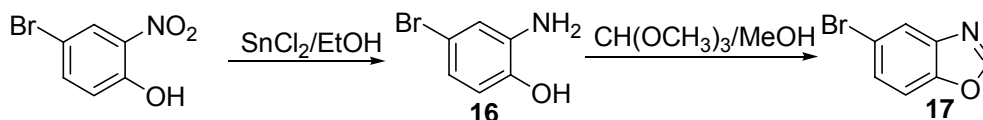


Figura 31. Procedimiento de obtención de 5-bromo-1,3-benzoxazol.

III.1.B.2. Síntesis de diarilmetanoles.

Una vez preparados los bromoderivados de partida se han sintetizado los diarilmetanoles, empleando la misma metodología utilizada en la obtención de los diarilmetanoles con resto *N*-metilindolilo.

Obtención de (5-bromo-1-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (69) y (6-bromo-1-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (70).

A pesar de utilizar 2 equivalentes de *n*BuLi por cada uno de bromobenzimidazol, no se evitó la aparición de derivados unidos a través de la posición 2 del benzimidazol. De este modo, partiendo de la mezcla de los isómeros **14** y **15**, se obtienen los diarilmetanoles **69** y **70** que mantienen el bromo en la posición 5 y 6, respectivamente. Mediante cromatografía sobre gel de sílice fue posible la separación de los isómeros que se obtienen con un rendimiento del 28% (**69**) y del 33% (**70**).

La identificación de cada uno de los alcoholes isómeros no se pudo realizar directamente, por lo que se ha deducido a partir de las cetonas a que dan lugar por oxidación. Éstas, a su vez, se identificaron mediante experimentos de diferencia de *n*Oe. En el espectro de RMN ¹H se observa un mayor desapantallamiento de los hidrógenos que se encuentran en *orto* del nitrógeno no metilado (H₄ en **69** y H₇ en **70**), posiblemente debido al par de electrones.

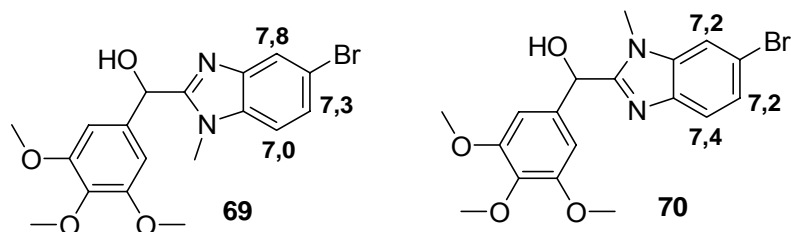


Figura 32. Señales espectroscópicas de ¹H RMN para los diarilmetanoles **69** y **70**.

Obtención de (1,3-benzoxazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (**73**):

Del mismo modo que en los derivados con resto indolilo y benzimidazolilo, el 5-bromo-1,3-benzoxazol se trató con 2 equivalentes de *n*BuLi para evitar la transmetalación y la formación de derivados unidos a través de la posición 2. La formación del compuesto **73** se observa en el espectro de RMN ¹H por la aparición de la señal del hidrógeno del puente metabólico, que resuena a 5,9 ppm y la presencia de las señales de los hidrógenos H₂, H₄, H₆ y H₇ del resto benzoxazolilo.

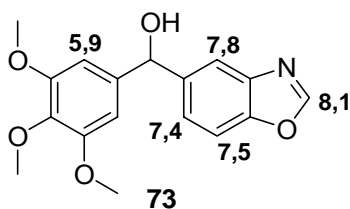


Figura 33. Señales espectroscópicas de RMN ¹H del compuesto **73**.

III.1.B.3. Síntesis de fenstatinas.

La oxidación de estos derivados metanólicos se llevó a cabo usando permanganato potásico o dicromato de piridinio, oxidantes ya utilizados en este trabajo previamente. En la tabla se detalla el oxidante usado en cada caso y el rendimiento obtenido tras purificación mediante cromatografía en columna.

<i>Producto</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
71	KMnO ₄ 24h	41
72	PDC 24h	69
74	PDC 24h	26

Tabla 4. Rendimiento y condiciones usadas en la obtención de los compuestos **71**, **72** y **74**.

En el espectro de RMN ¹H se puede destacar el despantallamiento que se observa tanto en las señales de los hidrógenos del trimetoxifenilo (de 6,6 ppm a 7,1 y 7,6 ppm) como en los hidrógenos del anillo Ar₂, donde las diferencias oscilan entre 0,2 y 0,4 ppm.

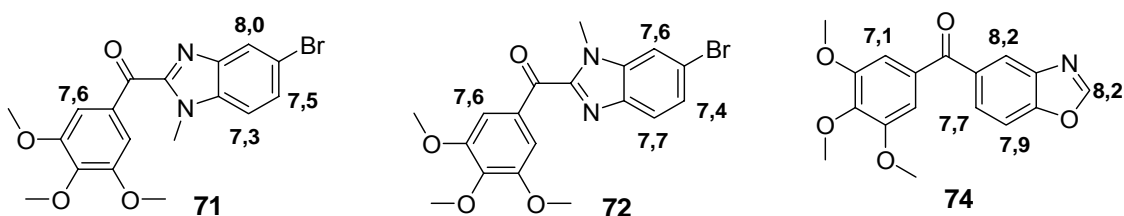


Figura 34. Señales espectroscópicas de RMN ¹H de las fenstatinas **71**, **72** y **74**.

La posición del bromo en **71** y **72** se ha establecido mediante experimentos de diferencia de nOe. Cuando se irradia el metilo unido a N, en **71** se observa nOe con el doblete de *J*~8 Hz a 7,3 ppm, mientras que en **72**, el nOe se produce con un doblete de *J*~2 Hz que aparece a 7,6 ppm. La comparación de los valores de δ para **71** y **72** (figura 34) indica que los protones en *orto* del N no metilado están desapantallados.

III.1.C. Síntesis de derivados de combretastatinas.

Una vez sintetizados los derivados de fenstatina del apartado anterior, el tercer objetivo de este trabajo se completa con la obtención de varias combretastatinas que posean la misma combinación de anillos aromáticos que algunas de las fenstatinas e isocombretastatinas sintetizadas, con el fin de establecer las comparaciones oportunas. Para ello, se seleccionó como anillo Ar₁ el resto 3,4,5-trimetoxifenilo y como anillos Ar₂ los restos *N*-metilindol-3-carbaldehído, *N*-etilindol-3-carbaldehído, *N*-metilindol-3-metanol y *N*-metilbenzimidazol.

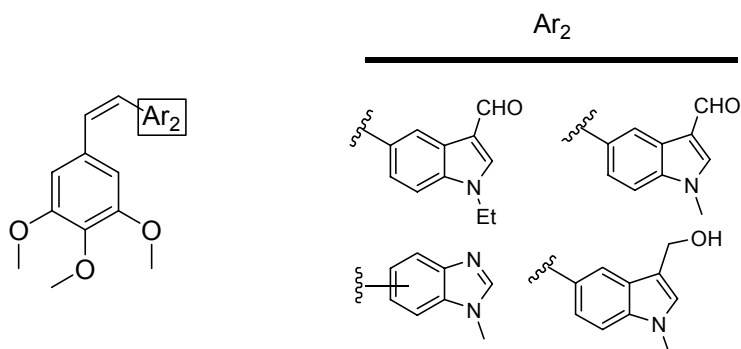
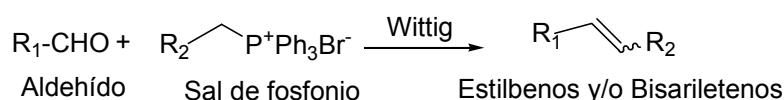


Figura 35. Sistemas derivados de indol y benzimidazol seleccionados para ensayos de actividad de combretastatinas análogas.

La metodología más ampliamente descrita para la síntesis de análogos de combretastatina es la reacción de Wittig, que genera un doble enlace que puede tener estereoquímica *Z*, *E* o resultar una mezcla de ambas.⁴³

Esta metodología es la empleada habitualmente en bibliografía y ha sido aplicada satisfactoriamente en trabajos anteriores del grupo de investigación y en la síntesis de isocombretastatinas comentada anteriormente.



Esquema 4. Obtención de análogos de combretastatina.

⁴³ a) March, J. *Advanced Organic Chemistry*. J. Willey & Sons, Inc.; New York **1985**. b) Smith, M. B. *Organic Synthesis*. McGrawHill; London **1994**. c) Bestmann, H. J. *Pure Appl. Chem.* **1980**, 52.

En este caso se ha utilizado la sal de fosfonio derivada del bromuro de 3,4,5-trimetoxibencilo y los aldehídos aromáticos correspondientes al anillo Ar₂, como materiales de partida para la reacción de Wittig.

III.1.C.1. Materiales de partida.

Los aldehídos aromáticos Ar₂ seleccionados son, en todos los casos, derivados de indol o de benzimidazol, por lo que fue necesaria la introducción de un metilo sobre el N en posición 1 por las razones que ya se han expuesto en los apartados anteriores.

Obtención de 1-metil-1*H*-indol-5-carbaldehído (4).

El derivado metilado se obtiene en un 93% por alquilación con ioduro de metilo en condiciones de transferencia de fase.

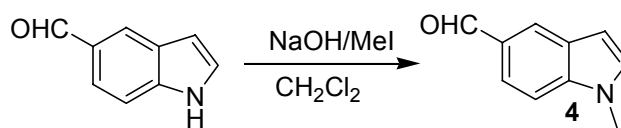


Figura 36. Metilación de 1*H*-indol-5-carbaldehído.

Obtención de 1-etil-1*H*-indol-3,5-dicarbaldehído (3).

En este caso se decidió realizar en primer lugar la formilación del indol en la posición 3, al contrario que en el resto de los compuestos (en los que se realiza la formilación una vez sintetizado el compuesto diarílico), para evitar una posible isomerización *cis-trans* de la combretastatina debido al medio ácido de reacción empleado en la reacción de Vilsmeier-Haack. La formilación se lleva a cabo en las mismas condiciones descritas en el apartado A.5.2. Sin embargo, el rendimiento obtenido es bastante menor (29%) debido a que se producen reacciones de polimerización. Posteriormente se comprobó que la realización de la formilación una vez obtenida la combretastatina, no provoca la isomerización del doble enlace (ver apartado C2), por lo que la ruta para la síntesis de estos análogos se ha modificado y, en el resto de los casos, se ha realizado la formilación en una etapa posterior a la reacción de Wittig.

Una vez obtenido el dialdehído, se procede a la alquilación del NH usando como base carbonato potásico. La posterior adición de bromuro da como resultado el producto etilado con un rendimiento del 67%.

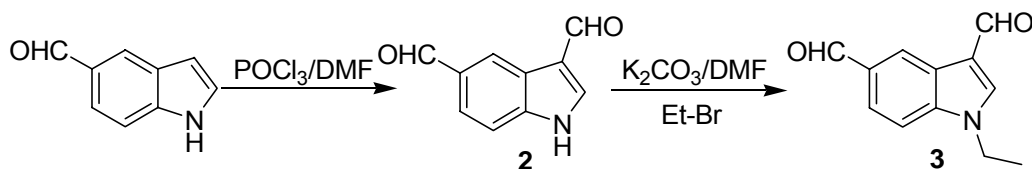


Figura 37. Obtención de 1-etil-1*H*-indol-3,5-dicarbaldehído.

Obtención de 1-metil-1*H*-benzimidazol-5-carbaldehído (7) y 1-metil-1*H*-benzimidazol-6-carbaldehído (8).

Para la obtención de los derivados benzimidazólicos se hicieron diversas pruebas a partir del ácido 1*H*-benzimidazol-5-carboxílico y resultó necesaria la reducción del grupo ácido hasta alcohol y su posterior oxidación a aldehído, como pasos previos a la metilación. Cuando se realizaba la alquilación del ácido, su elevada solubilidad acuosa impedía la recuperación del producto metilado y la *N*-alquilación del derivado metanólico conllevaba la introducción de un metilo sobre el oxígeno.

Tras ensayar varias secuencias de pasos, se estableció la siguiente ruta: reducción del ácido 1*H*-benzimidazol-5-carboxílico con hidruro de aluminio y litio hasta el alcohol, que posteriormente se oxida con dióxido de manganeso a 1*H*-benzimidazol-5-carbaldehído. La metilación con ioduro de metilo, mediante el tratamiento con hidróxido sódico en presencia de un catalizador de transferencia de fase, da lugar a la mezcla de los dos isómeros 7 y 8, al igual que en el caso del 5-bromo-1*H*-benzimidazol, y al compuesto 9 que se forma por la rotura del anillo imidazólico. Tras cromatografía en columna de gel de sílice se obtuvo la mezcla 1:1 de los isómeros 7 y 8 con un rendimiento del 44%.

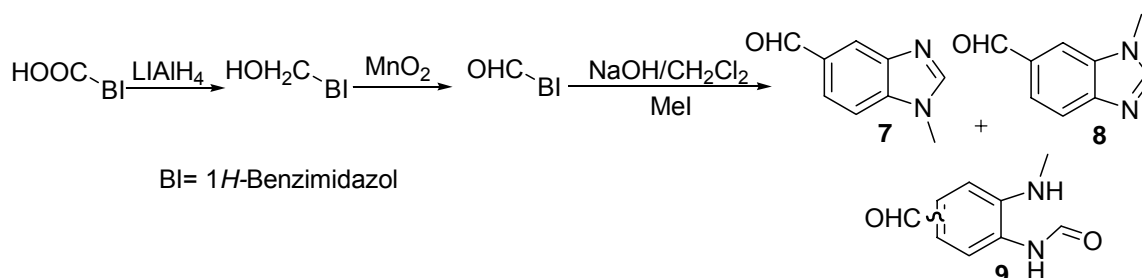


Figura 38. Procedimiento de obtención de los benzimidazoles metilados 7 y 8.

III.1.C.2. Síntesis de los análogos de combretastatinas.

La formación del doble enlace se realiza, en nuestro caso, entre un aldehído y la sal de 3,4,5-trimetoxibencil(trifenil)fosfonio. Para la formación del iluro se emplean las siguientes condiciones: tratamiento de la sal de fosfonio con *n*BuLi en THF seco a baja temperatura, observándose que la disolución cambia a un color rojo oscuro, indicativo de la formación del iluro. Posteriormente, y a esta temperatura, se añade el aldehído correspondiente y se deja que alcance la temperatura ambiente. El producto de reacción se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice.

La asignación de los dos posibles isómeros (*Z* y *E*) se realiza a partir de las diferencias observadas en los datos espectroscópicos:

- 1) el desplazamiento químico de los protones olefínicos, que aparece a campo más bajo en el *trans* (~7,0 ppm) que en el *cis* (~ 6,7 ppm).
- 2) la constante de acoplamiento de los dobletes de los protones olefínicos (12 y 16 Hz para *Z* y *E* respectivamente).
- 3) el desplazamiento químico los 6 protones de los metoxilos equivalentes y los 2 protones aromáticos del resto trimetoxifenilo, que en los isómeros *cis* están apantallados con respecto a los isómeros *trans*. Éste apantallamiento se debe a la corriente del otro anillo aromático, que sólo se encuentra cerca en los isómeros *cis*.

Obtención de (Z)-N-etil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (75).

Para la obtención del compuesto **75** se adiciona el iluro sobre una disolución del dialdehído **3** en THF a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta inversión en la adición tiene como fin favorecer la reacción del aldehído más reactivo con el iluro de fósforo y evitar la formación de compuestos triarílicos (reacción de los dos grupos aldehídos). El compuesto **75** se caracteriza espectroscópicamente por el desplazamiento químico y la constante de acoplamiento que presentan los hidrógenos olefínicos en el espectro de RMN ^1H : 6,51 y 6,73 ppm; $J=12,3\text{ Hz}$, así como por el apantallamiento que se observa en los protones H-4 y H-6 del indol.

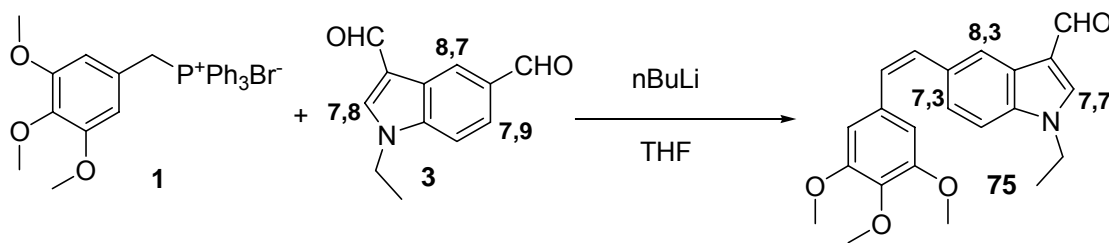


Figura 39. Obtención del compuesto **75**.

Tras sucesivas cromatografías en columna se obtiene el compuesto con un rendimiento de tan sólo el 5%, por lo que en las síntesis siguientes se ha preferido realizar la formilación sobre el compuesto diarílico en vez de hacerlo previamente sobre el material de partida.

Obtención de (*Z* y *E*)-1-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-benzimidazol (**79Z** y **79E**) y de (*Z* y *E*)-1-metil-6-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-benzimidazol (**80Z** y **80E**).

La adición de la mezcla de los benzimidazoles **7** y **8** sobre el iluro de fósforo de 3,4,5-trimetoxifenilo genera los correspondientes isómeros *Z* y *E* de los compuestos **79** y **80**, con un rendimiento del 69 % tras cromatografía en columna de gel de sílice. En los espectros de RMN tan sólo se observa uno de los isómeros *trans*, que se separa por cristalización.

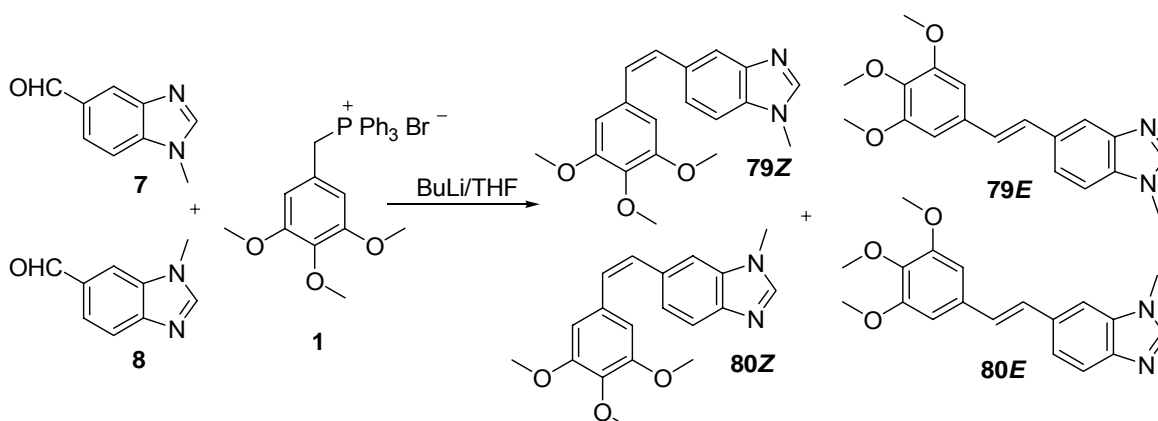


Figura 40. Obtención de los compuestos **79** (*Z* y *E*) y **80** (*Z* y *E*).

Obtención de (*Z* y *E*)-*N*-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-indol (**76**).

Como resultado de la reacción se obtuvo una mezcla 1:1 de los compuestos **76Z** y **76E**, que se separan por cromatografía.

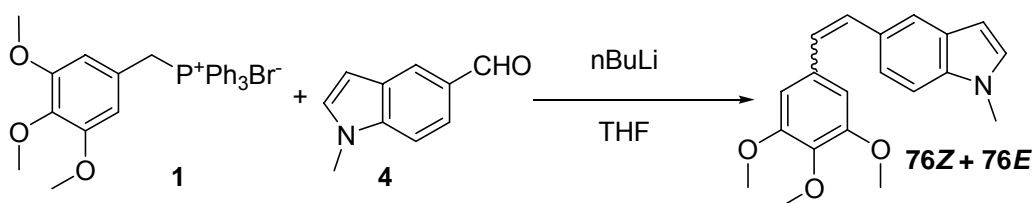


Figura 41. Obtención de los compuestos **76Z** y **76E**.

Obtención de (Z)-N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]indol-3-carbaldehído (77) y obtención de (Z)-(N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]indol-3-il)metanol (78).

Una vez obtenido el análogo de combretastatina con el resto *N*-metilindolilo y disposición *cis*, se procedió a la introducción de un grupo formilo en posición 3 del indol y su posterior reducción al derivado hidroxilado, dos de las modificaciones realizadas en las isocombretastatinas.

La metodología empleada en ambas reacciones es la misma que la descrita para las isocombretastatinas y produce buenos rendimientos en las dos reacciones: Un 93% en la formilación y un 89% en la reducción.

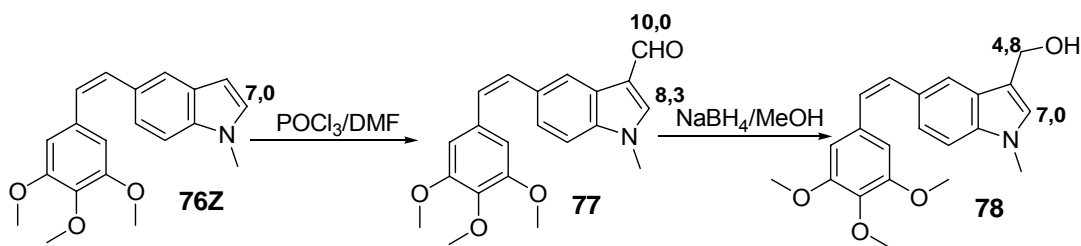


Figura 42. Preparación de los derivados formilado (77) y con hidroximetilo (78).

En el espectro de RMN ^1H podemos observar el desapantallamiento que sufre el hidrógeno de la posición 2 del indol cuando éste se formila y el consecuente apantallamiento cuando se reduce el grupo formilo.

III.2 SÍNTESIS DE COMPUESTOS MACROCÍCLICOS.

La parte sintética de este trabajo se completa con la obtención de dos familias de compuestos macrocíclicos relacionados con combretastatinas. La introducción de un espaciador para unir los anillos aromáticos tiene como fin mantener la disposición *cisoides* del puente, independientemente de la presencia o ausencia de un doble enlace, y restringir las posibilidades conformacionales de las combretastatinas.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo la síntesis de varias familias de combretastatinas macrocíclicas que combinan fenilos metoxilados en diferentes posiciones con diferentes funciones en el puente de dos carbonos (olefina, diol, diacetato...) y espaciadores (3-oxapentametileno, hexametileno, tetrametileno) que unen los anillos aromáticos por las posiciones *para-para* o *para-meta* respecto al puente.⁴⁴

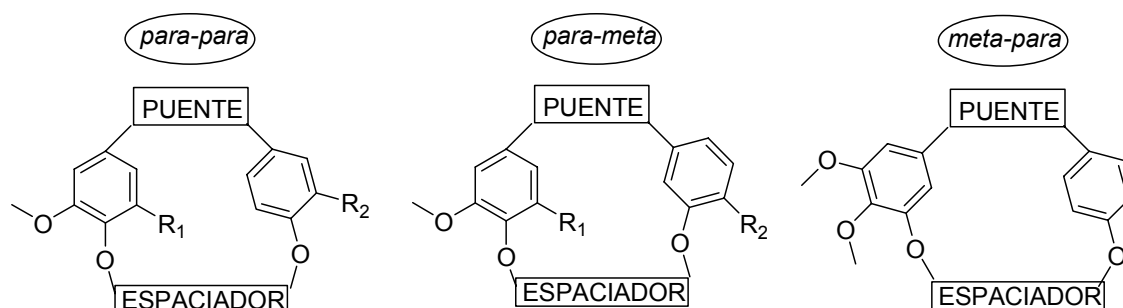


Figura 43. Esquema de combretastatinas macrocíclicas obtenidas previamente.

⁴⁴ a) Mateo, C. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, 2006. b) López, V. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, 2007.

En general, estos análogos macrocíclicos presentan una disminución en la actividad antimitótica, siendo los análogos más potentes aquellos que presentaban uniones *para-para* y el espaciador hexametileno.⁴⁵

Tomando como base los resultados previos, se decidió ampliar el estudio de estos análogos mediante la obtención de dos familias, que presentaran mayor restricción conformacional, manteniendo la unión *para-para* y el espaciador hexametileno. Por ello, se seleccionó como anillo Ar₂ un resto indolilo (buen sustituto del anillo de guayacol en combretastatinas⁴⁶) manteniendo como anillo Ar₁ un resto equivalente a un di ó trimetoxifenilo. Aunque los compuestos macrocíclicos preparados con anterioridad no habían resultado activos, la presencia del sistema bicíclico de indol supone una notable alteración estructural y de la dinámica de estos compuestos. Estudios previos de modelado molecular sugieren que el hueco en la tubulina ocupado por uno de los metoxilos del anillo de trimetoxifenilo de la podofilotoxina puede ser ocupado por uno de los metilenos del espaciador,⁴⁵ por lo que se decidió combinar el sistema indólico con restos fenilos que, además del espaciador, contuvieran uno o dos metoxilos (figura 44).

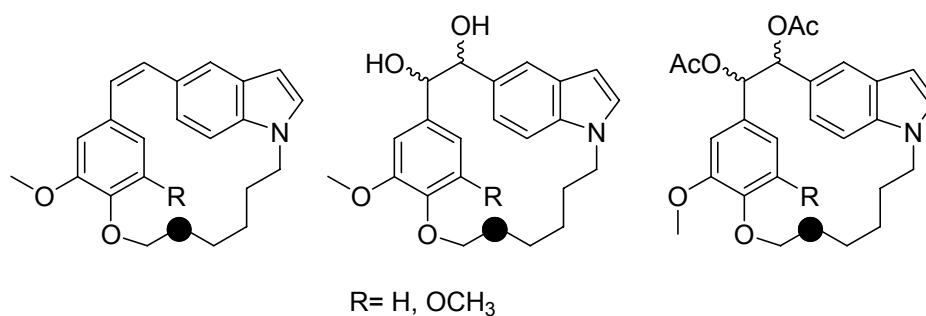


Figura 44. Análogos macrocíclicos obtenidos en este trabajo. En el espaciador se ha marcado la posición que puede ocupar el hueco cuando el metoxilo (R=OCH₃) está ausente (R=H).

⁴⁵ Mateo, C.; Álvarez, R.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Conformationally restricted macrocyclic analogues of combretastatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6316-6320.

⁴⁶ Maya, A. B.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 556-568.

El planteamiento general para la síntesis de estos compuestos se basa en la utilización de la reacción de McMurry para la obtención de las olefinas y dioles macrocíclicos. La selección de esta metodología, que implica el acoplamiento de carbonilos por titanio de baja valencia,⁴⁷ se debe a que en trabajos anteriores ha resultado ser la metodología más adecuada para este tipo de macrociclación. Los intentos de acceder a las olefinas macrocíclicas mediante reacciones de cierre de anillo por metátesis, empleando diversos catalizadores de Grubbs, tiempo y condiciones de reacción, resultaron infructuosas,⁴⁸ por lo que en este caso se optó por emplear directamente la reacción de McMurry.

La obtención de los dialdehídos se realiza mediante dos reacciones sucesivas de alquilación. En primer lugar se obtiene el intermedio monoarílico derivado del indol, común para las dos familias de compuestos a sintetizar y, posteriormente, se hace reaccionar este intermedio con el aldehído fenólico correspondiente, dando lugar a los dialdehídos que se utilizarán en la reacción de macrociclación.

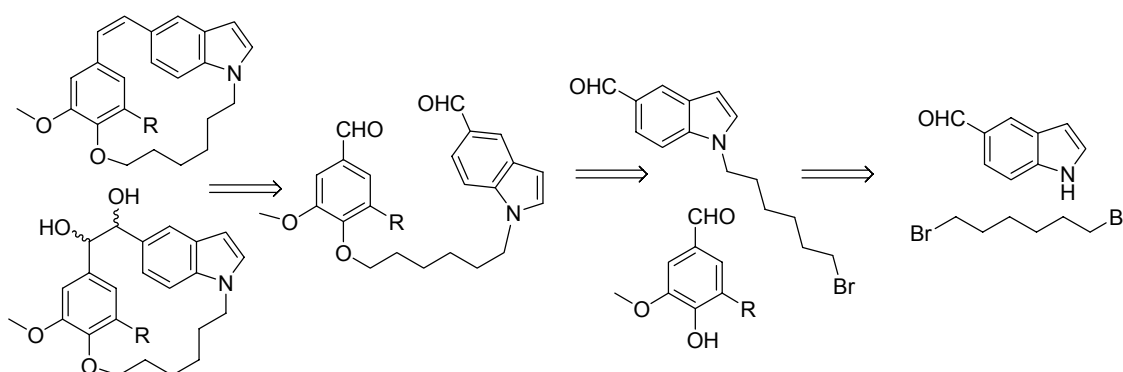


Figura 45. Análisis retrosintético de los análogos macrocíclicos.

⁴⁷ McMurry, J. E. Carbonyl-coupling reactions using low-valent titanium. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1513-1524.

⁴⁸ a) Mateo, C.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Stilbenophane Analogues of Deoxycombretastatin A-4. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6544 – 6547; b) Mateo, C.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Synthesis of a conformationally restricted polyoxygenated crownophane. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7055-7057. c) Mateo, C.; López, V.; Medarde, M.; Peláez, R. Synthesis and conformational analysis of macrocyclic hydroxystilbenes linked between the *para-para* positions. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7246-7256.

III.2.A. Intermedios monoarílicos y diarílicos.

Los materiales de partida utilizados para la obtención de los análogos macrocíclicos que constituyen el cuarto objetivo de este trabajo han sido indol-5-carbaldehído, vainillina y siringaldehído. Estos compuestos permiten la introducción de un espaciador mediante la alquilación del NH del indol y el grupo fenólico de los derivados de benzaldehído.

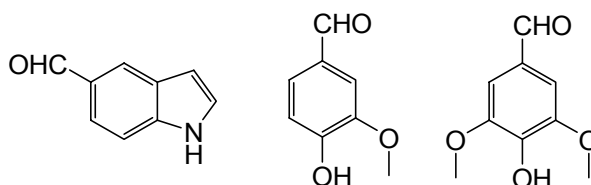


Figura 46. Materiales de partida empleados en la síntesis de análogos macrocíclicos.

La reacción de monoalquilación se produce, debido al carácter ácido del indol, mediante la formación del anión por tratamiento con bases en presencia de un catalizador de transferencia de fase (hidrogenosulfato de tetrabutilamonio), y la posterior adición de un exceso de 1,6-dibromohexano para evitar la formación de dímeros.⁴⁹

De esta manera, se ha obtenido, con un rendimiento del 72%, el compuesto **81** que se caracteriza por la aparición en el espectro de RMN ¹H de las señales correspondientes a la cadena alquílica introducida (4,1 ppm metileno unido a N y 3,3 ppm metileno unido al bromo, que en el espectro de RMN ¹³C resuenan a 46,5 ppm y 33,8 ppm, respectivamente).

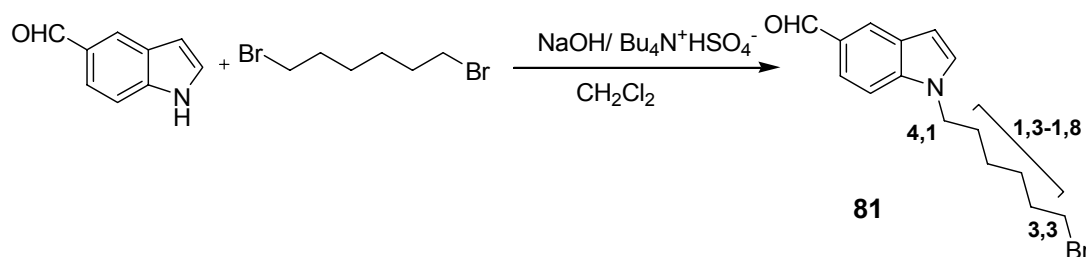


Figura 47. Obtención del compuesto **81**.

⁴⁹ McKillop, A.; Fiaud, J.-C.; Hug, R. P. The Use of Phase-Transfer Catalysis for the Synthesis of Phenol Ethers. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1379-1382.

Una vez obtenido el intermedio de síntesis con el sistema indolilo unido al espaciador, se realiza la segunda reacción de alquilación en dimetilformamida en presencia de carbonato,⁵⁰ debido a que la alquilación en las condiciones de transferencia de fase condujeron en todos los casos a la obtención de los materiales de partida inalterados.

La utilización de un exceso de carbonato potásico en dimetilformamida conduce a la obtención de los compuestos **82** y **83** de forma cuantitativa. En los espectros de RMN ¹³C cabe destacar la aparición de la señal correspondiente a los metilenos unidos al oxígeno fenólico que resuenan a 69 y 73 ppm.

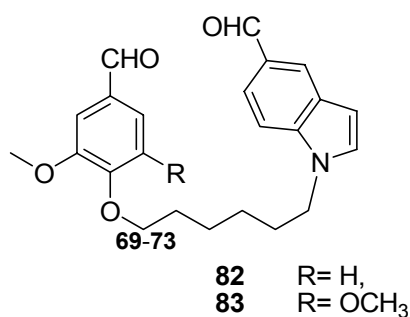


Figura 48. Señales de RMN ¹³C características de los compuestos **82** y **83**.

⁵⁰ Kao, C.-L.; Chern, J.-W. A convenient synthesis of naturally occurring benzofuran ailanthoidol. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1111-1113.

III.2.B. Compuestos macrocíclicos.

La reacción de McMurry es un método eficiente para la preparación de olefinas estéricamente impedidas y pensionadas,⁵¹ por lo que se decidió emplear en la realización de las reacciones de macrociclación. Este método permite obtener olefinas y/o pinacoles variando las condiciones de temperatura y tiempo de reacción. Mientras que a bajas temperaturas sólo suelen obtenerse pinacoles, la realización de la reacción a reflujo permite la formación preferente de las olefinas. También se ha observado que tiempos prolongados de reacción conllevan la degradación de los productos.^{44,48}

La reacción de McMurry, generalmente, se completa en dos pasos: primero se realiza la preparación del titanio de baja valencia a partir de $TiCl_n$ ($n= 3, 4$) por tratamiento con un agente reductor y en segundo lugar se añade el compuesto dicarbonílico a la mezcla.

Para la síntesis de los análogos de combretastatina de este trabajo se han empleado 20 moles de $TiCl_4$ y 10 moles de Zn por cada mol de dialdehído. El primer paso de la reacción ha tenido lugar a 0 °C, mientras que, tras la adición del intermedio diarílico, la reacción se ha mantenido a reflujo durante 5 horas. Bajo estas condiciones de calentamiento durante tiempos de reacción no muy prolongados, es posible obtener tanto las olefinas como los pinacoles correspondientes en una sola reacción. Se utiliza una alta dilución en THF para lograr la ciclación intramolecular y evitar la polimerización intermolecular.

⁵¹ Ephritikhine, M. A new look at the McMurry reaction. *Chem. Commun.* **1998**, 2549-2554. b) Columbus, I.; Biali, S. E. Gear Effects in Polycyclohexyl Systems: Tetracyclohexylethene. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3402-3407.

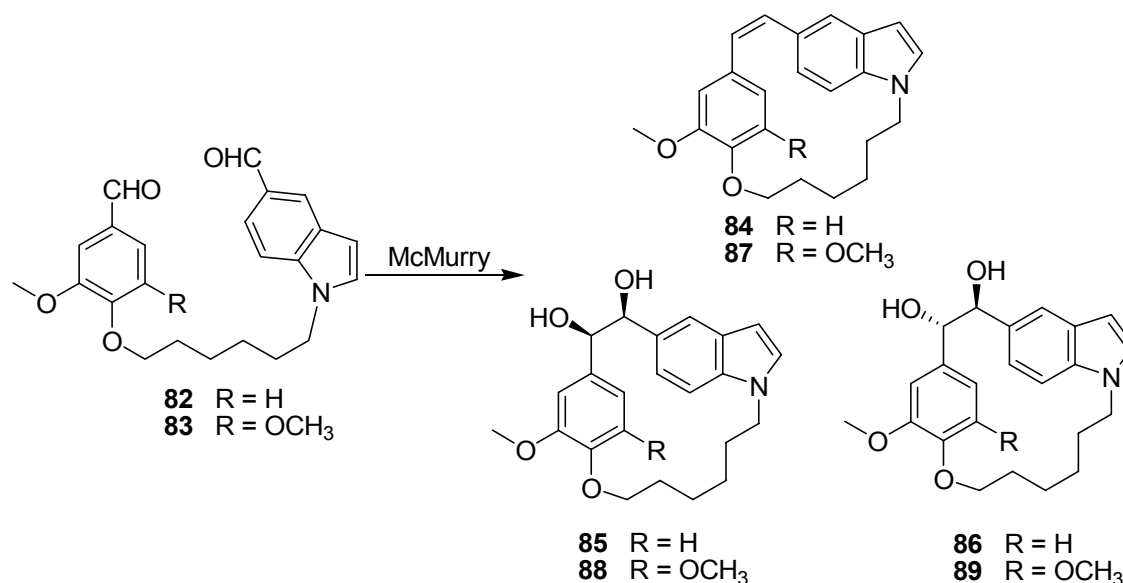


Figura 49. Compuestos obtenidos por el método de McMurry

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Material de partida	Concentración del dialdehído (mM)	% olefinas	% diol <i>cis</i>	% diol <i>trans</i>	Rendimiento total (%)
82	15	10	21	27	58
83	5	30	18	3	51

Tabla 5. Rendimientos obtenidos en las reacciones de macrociclación (compuestos aislados mediante CC).

Una vez obtenidos los dioles *cis* y *trans* de ambas familias, se procedió a realizar las acetilaciones de los mismos. La introducción de un grupo atractor de electrones de mayor volumen puede modificar el carácter hidrofóbico, la solubilidad y la capacidad de establecer enlaces de hidrógeno sin afectar sustancialmente la disposición de los anillos. De esta manera, además de estudiar las modificaciones que estas variaciones suponen en la actividad antimicrobica de los compuestos, el análisis espectroscópico de estos acetatos puede ayudar a la asignación de la estereoquímica de los dioles. Los rendimientos obtenidos en estas reacciones van desde el 32 al 73 % y en sus espectros de RMN se observan las señales características de los grupos acetato (2,04-2,34 ppm en ¹H y 21,0-21,2 y 170,0-171,1 ppm en ¹³C) como variación más apreciable.

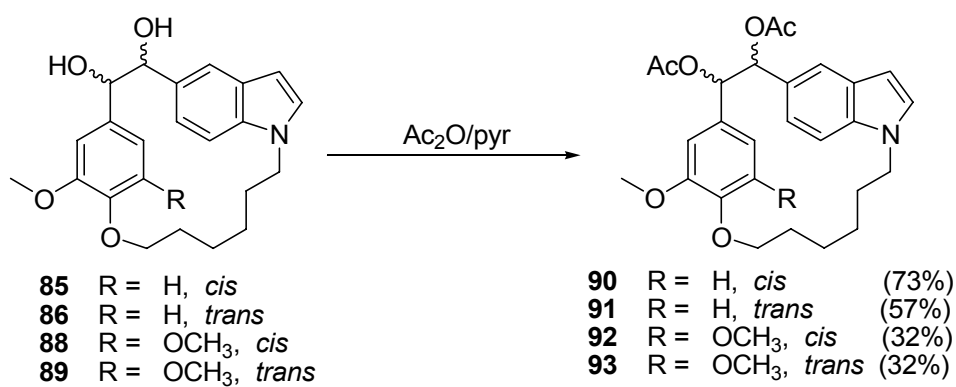


Figura 50. Compuestos macrocíclicos acetilados obtenidos.

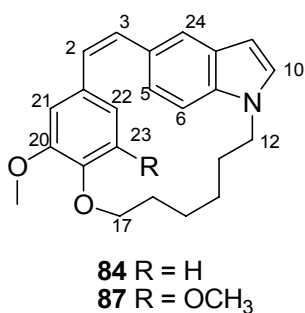
III.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LOS COMPUESTOS MACROCÍCLICOS.

La determinación estructural de los compuestos se lleva a cabo mediante RMN ^1H y ^{13}C y por difracción de Rayos X realizada sobre los cristales del compuesto **87**.

III.3.A. Olefinas.

Las olefinas sintetizadas presentan un juego único de señales, en el que los protones equivalentes presentan una señal común única.

Los protones olefinicos aparecen en ambos compuestos en el espectro de RMN ^1H con desplazamientos muy semejantes y presentan un valor de la constante de acoplamiento típico de doble enlace *cis* ($J= 10$ Hz).



H	84	87
2	6,92 <i>d</i> 10,2	6,92 <i>d</i> 10,1
3	7,14 <i>d</i> 10,2	7,16 <i>d</i> 10,1
5	6,38 <i>dd</i> 7,9; 1,8	6,45 <i>dd</i> 8,2; 1,4
6	6,83 <i>d</i> 7,9	6,87 <i>d</i> 8,2
21	6,44 <i>sa</i>	6,05 <i>sa</i>
22	6,25 <i>dd</i> 8,1;1,8	6,05 <i>sa</i>
23	6,47 <i>d</i> 8,1	-
24	7,40 <i>s</i>	7,40 <i>s</i>
OCH ₃ -C ₂₀	3,55 <i>s</i>	3,45 <i>sa</i>
OCH ₃ -C ₂₃	-	3,45 <i>sa</i>

Tabla 6. Señales espectroscópicas características de las olefinas sintetizadas.

Como característica a destacar, en el caso del compuesto más sustituido (**87**), las señales del anillo simétrico tetrasustituido aparecen ensanchadas, indicando que se ha producido una alteración de la movilidad (intercambio conformacional) del sistema macrocíclico.

La olefina **87** es cristalina, por lo que su conformación en estado sólido ha sido determinada mediante difracción de rayos X.

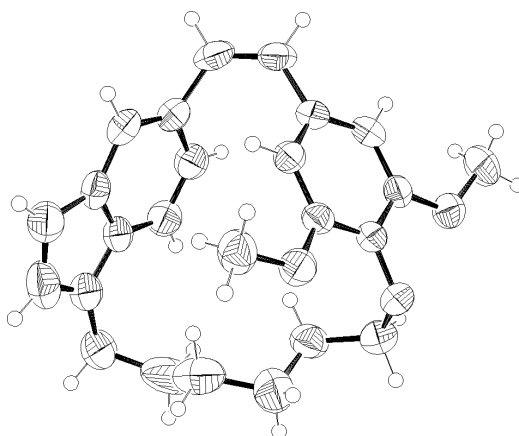


Figura 51. Estructura obtenida por difracción de Rayos X de la olefina **87**.

III.3.B. Dioles y acetatos.

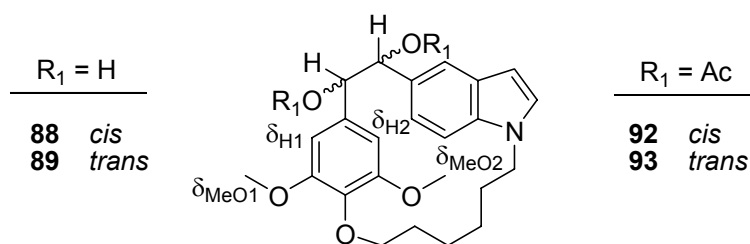
A partir del análisis espectroscópico de dioles sintetizados previamente en nuestro grupo de trabajo,^{44,48} se han determinado las diferencias existentes entre los isómeros *cis* y *trans* (tabla 7). Una diferencia fundamental es la constante de acoplamiento (J) entre los dos metinos del puente, menor de 5,5 Hz para los compuestos con estereoquímica *cis* y mayor de 6,5 Hz para los que tienen estereoquímica *trans*. Además de las diferencias en la constante de acoplamiento, los glicoles con estereoquímica *cis* presentan un desplazamiento promedio de los dos protones del puente mayor de 4,70 ppm en RMN ^1H y desplazamientos por debajo de 77,5 ppm en RMN ^{13}C para los carbonos oxigenados del puente. Por el contrario, los glicoles con estereoquímica *trans* presentan un desplazamiento promedio de los protones del puente inferior a 4,70 ppm en RMN ^1H y desplazamientos superiores a 79,5 ppm en RMN ^{13}C para los carbonos oxigenados del puente.

	Estereoquímica	J (Hz)	δ_{promedio} (ppm)	δ_{promedio} (ppm)
	<i>Cis</i>	$< 5,5$	$> 4,70$ $< 77,5$	$> 6,00$ $< 76,0$
<i>Trans</i>	$> 6,5$	$< 4,65$ $> 79,5$	$< 6,00$ $> 77,0$	
			Glicoles	Acetatos

Tabla 7. Diferencias espectroscópicas entre los isómeros *cis* y *trans* de glicoles y diacetatos macrocíclicos.

Mediante tratamiento con anhídrido acético se obtienen, en todos los casos, los acetatos con las propiedades espectroscópicas características del grupo estereoquímico al que pertenece el glicol de partida. Las únicas diferencias apreciables son las debidas al desplazamiento producido por la presencia del grupo acetato, lo que indica que el cambio no tiene grandes efectos ni en la estructura ni en la dinámica de los compuestos y que la información obtenida en los glicoles puede trasladarse a los acetatos y viceversa.

Los datos espectroscópicos empleados para establecer la estereoquímica relativa de los dioles y acetatos obtenidos en este trabajo se muestran en la tabla 8. Los compuestos en los que aparecen datos duplicados se corresponden con aquellos en los que en los espectros de RMN se observan dos juegos de señales pertenecientes a dos conformaciones diferentes.



Compuesto	J (Hz)	$\delta^1 H$ (ppm)			$\delta^{13} C$ (ppm)			<i>cis</i>	<i>trans</i>
		H ₁	H ₂	Prom.	C ₁	C ₂	Prom.		
85	--	5,25	4,91	5,08	--	--	--	X	
		5,36	4,82	5,09					
86	7,8	4,73	4,66	4,70	--	--	--		X
88	3,8	5,17	4,87	5,02	74,7	77,7	76,2	X	
		5,32	4,76	5,04	75,3	77,7	76,5		
89	8,1	4,64	4,71	4,69	82,6	82,0	82,3		X
90	4,5	5,99	6,60	6,30	73,7	77,4	75,6	X	
		5,99	6,60	6,30	74,5	77,0	75,8		
91	7,9	6,08	6,27	6,18	79,5	79,2	79,4		X
		8,0	5,99	6,07	6,03	79,5	78,7		
92	--	6,40	6,00	6,20	--	--	--	X	
		6,40	5,90	6,15					
93	8,8	5,93	6,02	5,98	79,5	79,1	79,3		X

Tabla 8. Datos de RMN que permiten el establecimiento de la estereoquímica relativa.

En general, los datos obtenidos coinciden con lo establecido en los trabajos anteriores.^{44,48} De esta manera, se observa que:

- La constante de acoplamiento entre los hidrógenos del puente permite diferenciar los compuestos con estereoquímica relativa *trans* ($J > 7,5$ Hz) de los *cis* ($J < 5,0$ Hz).
- El desplazamiento químico promedio de los protones del puente para los derivados con estereoquímica *cis* es mayor de 5,00 ppm para los glicoles y de 6,20 ppm para los acetatos. En el caso de los derivados *trans* no se cumple exactamente lo visto anteriormente ($< 4,65$ ppm en glicoles y $< 6,00$ ppm en acetatos); no obstante, el desplazamiento promedio es menor de 4,70 ppm en los dioles y menor de 6,2 ppm en los acetatos, por lo que la diferencia con los isómeros *cis* es apreciable.

- El desplazamiento químico promedio de los metinos oxigenados (para los compuestos de los que se tienen los datos de RMN ^{13}C) coincide con lo establecido previamente. En los glicoles es menor de 77,5 ppm para los compuestos con estereoquímica *cis* y mayor de 79,5 ppm para los de estereoquímica *trans* y en los acetatos es menor de 76,0 ppm y mayor de 77,0 ppm respectivamente.

Adicionalmente, en los compuestos con un anillo aromático simétrico derivado de siringaldehído (tabla 9), se había observado que las diferencias de desplazamiento químico entre los hidrógenos de los dos grupos metoxilo eran menores a 0,20 ppm para los compuestos con estereoquímica *cis* y mayores a 0,20 ppm en el caso de los derivados *trans*. Igualmente se había observado que la diferencia de desplazamiento químico entre los dos hidrógenos del anillo aromático era menor de 0,70 ppm en los derivados *cis*, mientras que para los derivados *trans* era, en todos los casos, mayor de 0,75 ppm.

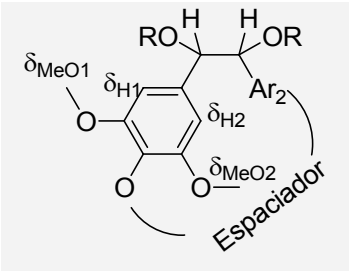
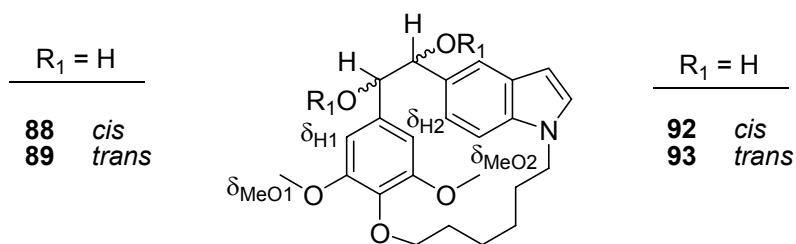
	Estereoquímica	$\Delta \delta_{\text{HAr}}$	$\Delta \delta_{\text{OMe}}$
<i>cis</i>		< 0,70	< 0,20
<i>trans</i>		> 0,75	> 0,20

Tabla 9. Diferencias en el desplazamiento químico de protones químicamente equivalentes observadas en compuestos macrocíclicos obtenidos con anterioridad.

Sin embargo, en los compuestos sintetizados en este trabajo, se observa que las diferencias entre los protones químicamente equivalentes de los compuestos que combinan un anillo indólico con un anillo derivado de siringaldehído son siempre mayores a 0,70 ppm (tabla 10), no apreciándose diferencia entre las configuraciones *cis* y *trans*. Esto puede ser debido a una mayor restricción en los intercambios conformacionales, producida por la mayor rigidez que aporta el anillo indólico al sistema.



Compuesto	Estereoquímica	δ_{OMe1}	δ_{OMe2}	$\Delta \delta_{OMe}$	δ_{H1}	δ_{H2}	$\Delta \delta_{HAr}$
88	<i>cis</i>	3,81	3,00	0,81	6,23	5,89	0,34
		3,86	3,00	0,86	6,77	5,32	1,45
89	<i>trans</i>	3,86	2,97	0,89	6,66	5,37	1,29
92	<i>cis</i>	3,84	3,00	0,84	6,60	5,70	0,90
		3,89	3,00	0,89	6,73	5,45	1,28
93	<i>trans</i>	3,86	3,10	0,76	6,55	5,67	0,88

Tabla 10. Diferencias en el desplazamiento químico de protones químicamente equivalentes.

III.4. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LOS COMPUESTOS MACROCÍCLICOS.

Como se ha indicado en el planteamiento, los compuestos macrocíclicos indólicos sintetizados en este trabajo son la última etapa de una serie de trabajos encaminados a estudiar la posibilidad de bloquear la disposición *cisoid*e de los anillos aromáticos de las combretastatinas, que se considera la más adecuada para su actividad.^{44,45,48}

Durante las distintas etapas de este proceso se ha observado que la macrociclación conduce a restricciones en la movilidad de los compuestos, que se traducen en notables diferencias en sus espectros de RMN. Con el fin de racionalizar estas diferencias, los compuestos han sido agrupados en función del patrón de sustitución en el puente de dos carbonos que une los anillos aromáticos en: olefinas, dioles *cis* y dioles *trans*. En cada apartado, se abordará:

- 1) El análisis de las posibles conformaciones que “*a priori*” pueden adoptar los macrociclos y las formas de pasar de unas a otras.
- 2) El estudio de las conformaciones energéticamente más accesibles según la mecánica molecular y las formas de interconversión de las mismas sugeridas por estudios de dinámica molecular.
- 3) La justificación de la apariencia de los espectros de RMN.

Los primeros compuestos macrocíclicos sintetizados por nuestro grupo de investigación se ajustaban estrictamente a las relaciones estructura actividad descritas para las combretastatinas. Estos compuestos presentaban una unión *para-para* de los anillos aromáticos y dos anillos aromáticos simétricos, uno disustituido y uno tetrasustituido.^{44a} La segunda generación consistió en compuestos con un anillo simétricamente y otro asimétricamente sustituidos.^{44b} La tercera y última generación, en la que se incluyen los compuestos sintetizados en este trabajo, implica la sustitución del anillo asimétricamente sustituido por un anillo de indol. Se esperaba que esta sustitución, motivada por la interesante actividad inhibidora de la polimerización de tubulina y citotóxica mostrada por análogos de combretastatinas que incorporaban un resto de *N*-metil-5-indolilo en lugar del resto de 3-hidroxi-4-metoxifenilo de la combretastatina A-4,⁵² aumentara notablemente la rigidez del sistema y contribuyera a establecer la importancia de los distintos procesos en la aparición de los espectros.

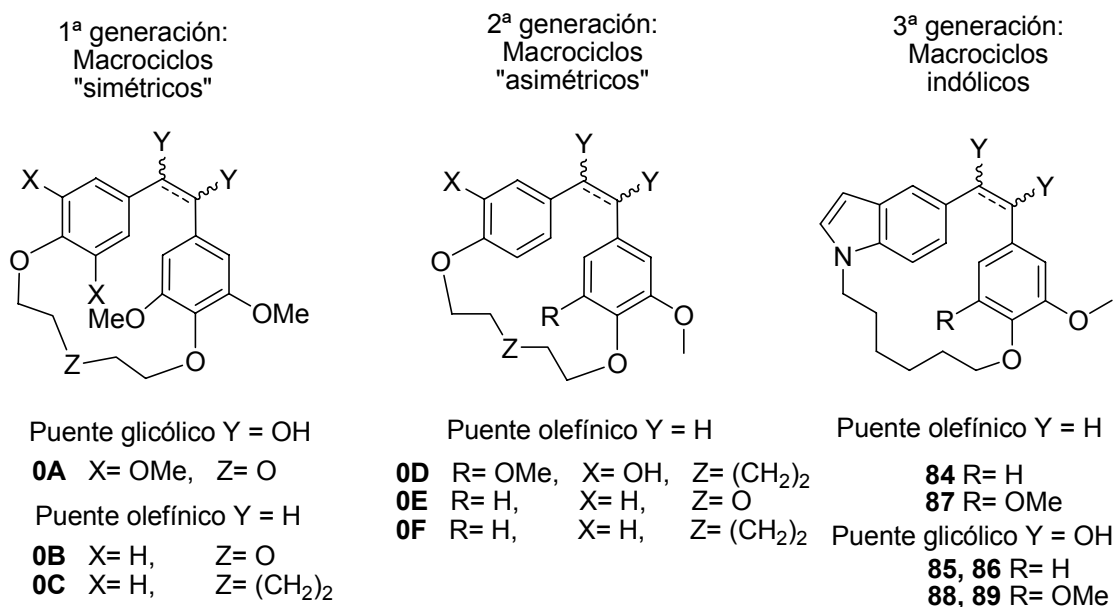


Figura 51. Estructura genérica de las distintas generaciones de compuestos macrocíclicos, con unión *para-para* de los anillos aromáticos, sintetizados en el grupo de trabajo y ejemplos representativos de cada uno de ellos. Los compuestos obtenidos en trabajos anteriores se han numerado de **0A** a **0F**.

⁵² a) Mateo, C. Trabajo de Grado, Universidad de Salamanca, 2002. b) Maya, A. B.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety *J. Med. Chem.* 2005, 48, 556–568.

III.4.A. Olefinas.

III.4.A.1. Análisis de conformaciones.

Las olefinas macrocíclicas simétricas (**OB-C**) muestran espectros de RMN sencillos en los que sólo se observa un juego de señales y no existen diferencias entre las posiciones químicamente equivalentes en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C .⁴⁸ La naturaleza simétrica de los dos anillos aromáticos permite que un simple cambio en la helicidad, que puede ocurrir fácilmente sin que ninguno de los anillos aromáticos atraviese el plano del doble enlace (ver figura 52), promedie los entornos magnéticos en los que se encuentran los núcleos químicamente equivalentes.

Los compuestos con al menos un anillo aromático no simétrico (**OD-F**) también presentaban espectros con un único juego de señales y en la mayoría de los casos los núcleos químicamente equivalente resonaban como una única señal. En este caso, la mera interconversión de hélices no permitía explicar la simplicidad de los espectros, por lo que se procedió a analizar con más detalle las conformaciones accesibles a los compuestos y las posibles vías de transición entre ellas.

El cambio de la disposición helicoidal del esqueleto estilbénico debe ser tenido en cuenta para analizar los correspondientes equilibrios conformacionales (Figura 52). Ambas hélices (- en la parte superior y + en la parte inferior) pueden interconvertirse mediante la rotación de un anillo, que conlleva el giro *flip* del otro anillo (Figura 52, parte izquierda) o el doble *flip* de los anillos (Figura 52, parte derecha). Un giro *flip* se produce cuando el plano del anillo, al girar, atraviesa la perpendicular al plano del doble enlace. En cambio, se denomina rotación del anillo cuando el anillo atraviesa el plano del doble enlace al girar.⁵³

⁵³ a) Biali, S. E.; Rappoport, Z. Stable simple enols. 3. Static and dynamic NMR behavior of crowded triarylethenols and related compounds. Three-ring flip as the threshold mechanism for enantiomerization of crowded triarylvinyl propellers. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 477-496. b) Rappoport, Z.; Biali, S. E. Threshold Rotational Mechanisms and Enantiomerization Barriers of Polyarylvinyl Propellers *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 307-314. c) Gur, E.; Kaftory, M.; Biali, S. E.; Rappoport, Z. Conformations and Threshold Rotational Mechanisms of the (Z)-1,2-Diarylethene Moiety: A Structural Correlation Study. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8144-8148. d) Gust, D.; Mislow, W.; Analysis of Isomerization in Compounds Displaying Restricted Rotation of Aryl Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1535-1547.

Cuando se produce una **rotación del anillo D**, la orientación de la posición marcada (•) de dicho anillo cambia de arriba abajo, mientras que la posición marcada (•) del anillo I permanece en la parte superior. Cuando tiene lugar un **doble flip**, ambas posiciones marcadas (•) permanecen en la parte superior del plano después del cambio de helicidad. La rotación simultánea de ambos anillos (giros cero *flip*), que conlleva el cambio de la orientación de las posiciones marcadas en los dos anillos, requeriría una disposición coplanar improbable de los dos anillos.

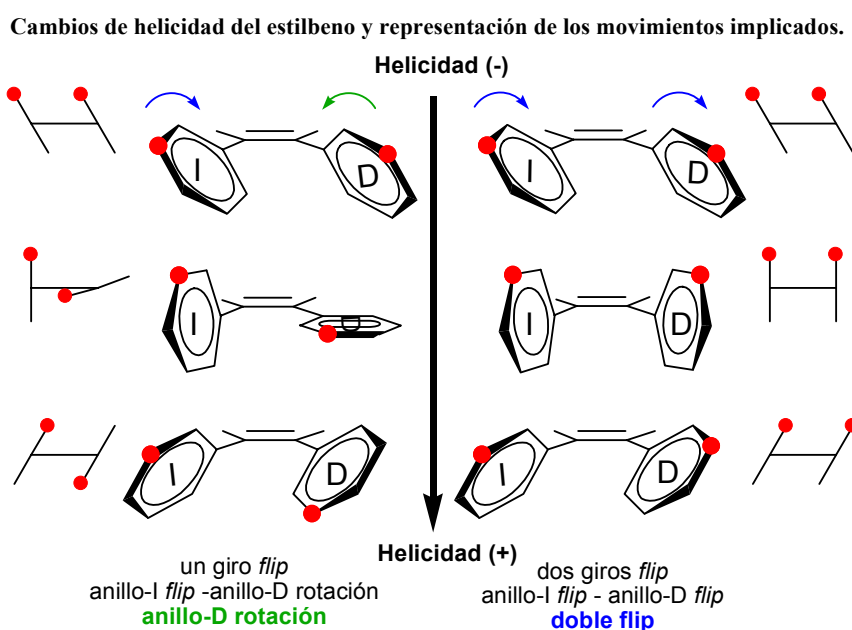


Figura 52. Se muestra el paso de helicidad negativa en la parte superior a helicidad positiva en la parte inferior, mediante **rotación de un anillo** (y *flip* del otro anillo) en la columna de la **izquierda** y el **doble flip** de los **anillos** en la **derecha**. Se incluye una representación esquemática en la que el plano del doble enlace se corresponde con la línea horizontal y los anillos aromáticos con las líneas verticales y oblicuas. Las posiciones marcadas (puntos rojos) facilitan la visualización de su localización por encima o debajo del plano del doble enlace. Anillo I: anillo representado a la izquierda; Anillo D: anillo representado a la derecha.

Del mismo modo, en los estilbenos macrocíclicos se producen cambios de helicidad por el paso de un anillo a través del espacio intra-anular (**rotación de dicho anillo**, *flip* del otro anillo) o por movimientos de **doble flip** (en los que ningún anillo pasa a través de ese espacio).

La combinación de dos disposiciones helicoidales (positiva y negativa) con dos situaciones distintas (por encima y por debajo del plano del doble enlace) para cada posición marcada (•) de cada anillo da lugar a $2 \times 2 \times 2 = 8$ posibilidades conformacionales, a considerar en el análisis conformacional de las olefinas macrocíclicas, como se representa en las figuras 53 a 58. Cuatro de las ocho posibilidades son imágenes especulares de las otras cuatro, se diferencian solamente en su disposición helicoidal, y son indistinguibles mediante RMN. Por ello, se han numerado las ocho conformaciones de I a IV precedidas por su disposición helicoidal (+ o -), con el fin de simplificar la identificación de los pares de imágenes especulares. Además, I y III son indistinguibles, al igual que II y IV, cuando el anillo D es simétrico, aunque las posiciones marcadas (•) están situadas en diferente lugar en cada caso.

La interconversión conformacional entre estas 8 posibilidades se puede producir por uno de estos procesos:

- a) **rotación del anillo I** (acompañado por el giro *flip* del anillo D).
- b) **rotación del anillo D** (acompañado por el giro *flip* del anillo I).
- c) **doble *flip*** (giro *flip* de los dos anillos).

En la figura siguiente, la **rotación del anillo I** (anillo T, tri-sustituido) está representada en sentido horizontal; la **rotación del anillo D** (anillo D, di-sustituido) está representada en sentido vertical y el **doble *flip*** está representado por las líneas oblicuas. Esta representación se mantendrá en las figuras de los equilibrios conformacionales, para cada uno de los compuestos analizados.

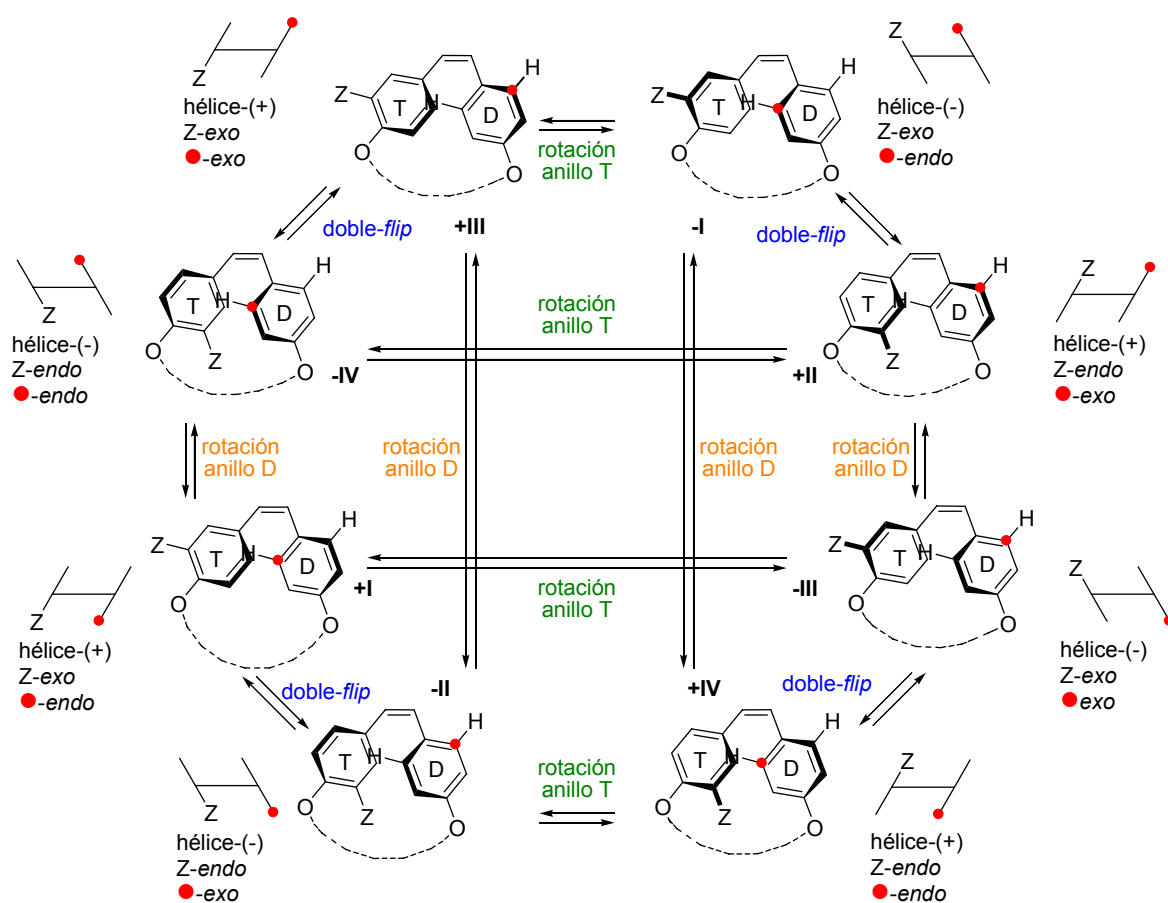


Figura 53. Equilibrio conformacional general de las olefinas con dos anillos fenilo. Se representa la **rotación del anillo-T** en sentido horizontal, la **rotación del anillo-D** en sentido vertical y el **doble flip** en sentido oblicuo. Anillos D y T: anillos Di-sustituídos y Tri-sustituídos.

Los espectros de RMN, de cada olefina macrocíclica obtenida, muestran un solo juego de señales, en todos los casos. Este hecho implica una interconversión rápida (en la escala de tiempo de la RMN) entre conformaciones (I-IV) que originen espectros diferentes. Además, en compuestos con un anillo simétrico los protones químicamente equivalentes dan lugar a señales únicas con un desplazamiento químico promedio. Esto requiere un intercambio rápido entre conformaciones que se diferencian sólo en el entorno magnético en el que se encuentran los núcleos magnéticamente equivalentes (como por ejemplo $\pm I$ y $\pm II$), por interconversión de las dos disposiciones helicoidales. Este hecho es interesante, ya que su análisis habría sido más complicado en sistemas con dos anillos no simétricos, puesto que en ellos el cambio de helicidad conduce a conformaciones que difieren en más elementos.

III.4.A.1.a. Olefinas macrocíclicas con dos restos fenilo. Equilibrio conformacional.

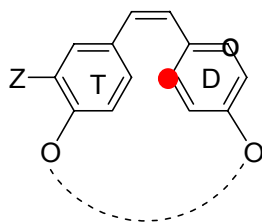
El análisis conformacional previo de los macrociclos con dos restos fenilo (uno simétrico y otro asimétrico, **0D-F**) facilitará el estudio de los macrociclos indólicos sintetizados en este trabajo, los cuales, debido a la presencia de un sistema bicíclico, presentan restricciones adicionales. De este modo, primero se analizará la relativa facilidad de estas interconversiones en el sistema con un anillo simétrico disustituido (**0F**, figura 54). Después, se considerará el efecto de un aumento en el grado de la dificultad para la rotación del anillo causada por:

- a) La disminución del tamaño del macrociclo al pasar de hexametileno a 3-oxapentametileno (**0E**, figura 55).
- b) Un aumento del tamaño de los sustituyentes de los anillo simétricos al pasar de H a grupos OMe (**0D**, figura 56).

Finalmente, se analizarán los compuestos sintetizados en este trabajo de tesis doctoral en los que el anillo trisustituido pasa a ser un anillo más rígido (resto indólico) y se combina con un anillo tetrasustituido (simétrico) (**87**, figura 57) o con un anillo trisustituido (situación en la que ninguno de los anillos es simétrico) (**84**, figura 58).

Independientemente de la naturaleza de los anillos aromáticos, si los tres tipos de movimientos de los anillos ocurren rápidamente en la escala de tiempo de la RMN, un promedio en el desplazamiento químico de las señales para las ocho conformaciones relevantes ($\pm I$ - $\pm IV$) y los protones químicamente equivalentes (en los casos con anillos simétricos) explican los espectros de RMN sencillos que se obtienen.

Si tan sólo uno de los movimientos fuese rápido en la escala de tiempo de la RMN, deberían observarse dos juegos completos de señales espectroscópicas o dos señales diferentes para los pares químicamente equivalentes (tabla 11 y figura 53).



Rotación anillo-T rápida. Rotación anillo D y Doble flip lentos	Rotación anillo-D rápida. Rotación anillo-T y Doble flip lentos	Doble-flip rápido. Rotación anillo-T y Rotación anillo-D lentos
$(\pm) \text{ I} \rightleftharpoons (\mp) \text{ III}$ Z- <i>exo</i> Z- <i>exo</i> ●- <i>endo</i> ●- <i>exo</i> O- <i>exo</i> O- <i>endo</i> ● y O promediadas Z- <i>exo</i>	$(\pm) \text{ I} \rightleftharpoons (\mp) \text{ IV}$ Z- <i>exo</i> Z- <i>endo</i> ●- <i>endo</i> ●- <i>endo</i> O- <i>exo</i> O- <i>exo</i> ●- <i>endo</i> ≠ O- <i>exo</i> Z- <i>promediado</i>	$(\pm) \text{ I} \rightleftharpoons (\mp) \text{ II}$ Z- <i>exo</i> Z- <i>endo</i> ●- <i>endo</i> ●- <i>exo</i> O- <i>exo</i> O- <i>endo</i> ● y O promediadas Z- <i>promediado</i>
$(\pm) \text{ II} \rightleftharpoons (\mp) \text{ IV}$ Z- <i>endo</i> Z- <i>endo</i> ●- <i>exo</i> ●- <i>endo</i> O- <i>endo</i> O- <i>exo</i> ● y O promediadas Z- <i>endo</i>	$(\pm) \text{ II} \rightleftharpoons (\mp) \text{ III}$ Z- <i>endo</i> Z- <i>exo</i> ●- <i>exo</i> ●- <i>exo</i> O- <i>endo</i> O- <i>endo</i> ●- <i>exo</i> ≠ O- <i>endo</i> Z- <i>promediado</i>	$(\pm) \text{ III} \rightleftharpoons (\mp) \text{ IV}$ Z- <i>exo</i> Z- <i>endo</i> ●- <i>exo</i> ●- <i>endo</i> O- <i>endo</i> O- <i>exo</i> ● y O promediadas Z- <i>promediado</i>
Z- <i>exo</i> ≠ Z- <i>endo</i>	●- <i>endo</i> ≠ ●- <i>exo</i> O- <i>exo</i> ≠ O- <i>endo</i>	●/O mismo lado que Z ≠ ●/O distinto lado que Z
Dos juegos de señales completos	Señales diferentes en el anillo D	Señales diferentes en el anillo D

Tabla 11. Equilibrios independientes resultantes si los movimientos (figura 53) indicados en cada columna son los únicos rápidos en la escala de tiempo de RMN. La disposición *endo* o *exo* del sustituyente Z del anillo trisustituido y de las posiciones químicamente equivalentes etiquetadas (● y O), se indican debajo del número de la conformación (I-IV). En la fila inferior se indican las posiciones que no se promedian en cada caso, por corresponder a movimientos lentos entre conformaciones. Finalmente, en la última fila se indica el resultado que debería observarse en cuanto a la diferencia de las señales de RMN en cada uno de los supuestos.

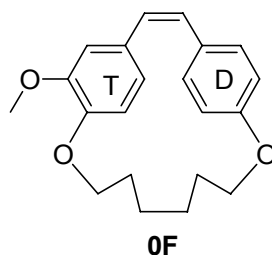
Si dos de los tres movimientos son rápidos en la escala de tiempo de la RMN (tabla 12), es posible explicar los datos observados experimentalmente (un solo juego de señales y átomos químicamente equivalentes como señal única) para determinados compuestos, debido a que las cuatro conformaciones representativas de todos los tipo (+I, -II, +III y -IV y -I, +II, -III y +IV) se interconvierten rápidamente.

Rotación anillo-T y Rotación anillo-D rápidas Doble flip lento	Rotación anillo-D y Doble flip rápidos Rotación anillo-T lento	Rotación anillo-T y Doble flip rápidos Rotación anillo-D lento
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>(±) I</p> <p>Z-exo</p> <p>●-endo</p> <p>O-exo</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(∓) III</p> <p>Z-exo</p> <p>●-exo</p> <p>O-endo</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">⇌</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>(∓) IV</p> <p>Z-endo</p> <p>●-endo</p> <p>O-exo</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(±) II</p> <p>Z-endo</p> <p>●-exo</p> <p>O-endo</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">⇌</p> <p style="text-align: center;">Z / ● / O : promediados</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>(±) I</p> <p>Z-exo</p> <p>●-endo</p> <p>O-exo</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(∓) IV</p> <p>Z-endo</p> <p>●-endo</p> <p>O-exo</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">⇌</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>(∓) II</p> <p>Z-endo</p> <p>●-exo</p> <p>O-endo</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(±) III</p> <p>Z-exo</p> <p>●-exo</p> <p>O-endo</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">⇌</p> <p style="text-align: center;">Z / ● / O : promediados</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>(±) I</p> <p>Z-exo</p> <p>●-endo</p> <p>O-exo</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(∓) III</p> <p>Z-exo</p> <p>●-exo</p> <p>O-endo</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">⇌</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>(∓) II</p> <p>Z-endo</p> <p>●-exo</p> <p>O-endo</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(±) IV</p> <p>Z-endo</p> <p>●-endo</p> <p>O-exo</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">⇌</p> <p style="text-align: center;">Z / ● / O : promediados</p>

Tabla 12. Equilibrios independientes resultantes si los movimientos rápidos (figura 53) en la escala de tiempo RMN son los indicados en la fila superior. Las flechas de equilibrio horizontales indican las conversiones producidas por el primer movimiento rápido y las verticales indican las conversiones producidas por el segundo movimiento rápido.

III.4.A.1.b. Olefinas macrocyclicas con un resto fenilo simétrico y otro asimétrico.

Análisis conformacional de **0D**, **0E** y **0F**.



El equilibrio conformacional para el compuesto **0F** se muestra en la figura 54. La mitad superior es idéntica a la inferior ($-I=-III$; $+II=+IV$; $+I=+III$; $-II=-IV$) y las conformaciones de la izquierda son imágenes especulares de las que se encuentran a la derecha.

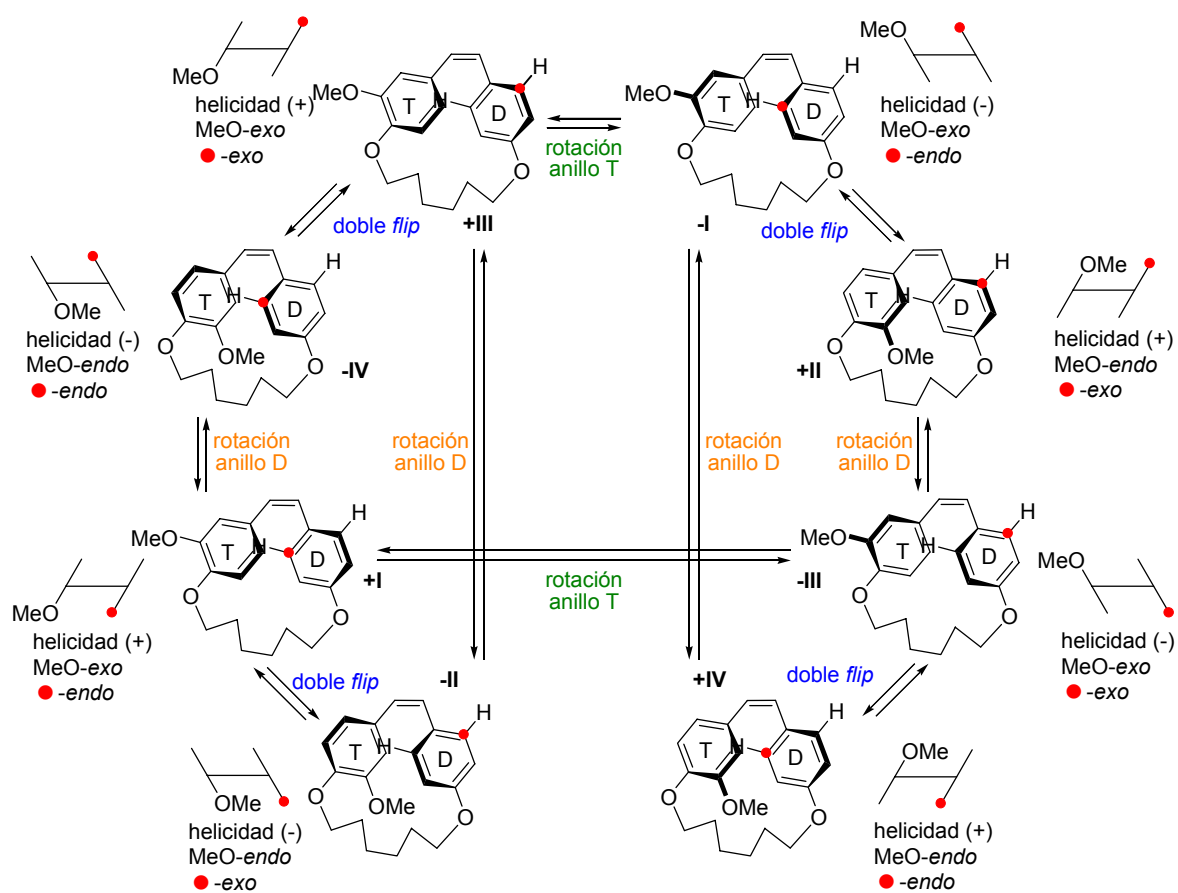
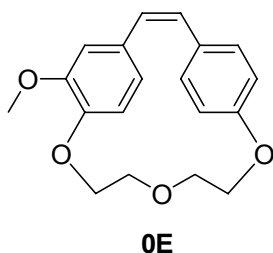


Figura 54. Equilibrio conformacional de la olefina **0F** (un anillo simétrico). Se requiere la rotación rápida del **anillo-D** y/o del **anillo-T** a través del espacio del macrociclo de 18 átomos y/o **rápido doble flip** para que las posiciones químicamente equivalentes aparezcan como una única señal en RMN.

Un equilibrio rápido entre las cuatro posibles conformaciones explica que las posiciones *orto* respecto al puente (marcadas (•) y no marcadas) y las posiciones *orto* respecto al espaciador en el anillo-D se observen como una sola señal de intensidad doble. Este intercambio rápido también explica que para el anillo-T se observe un promedio de las señales de ambas disposiciones (*exo*-OMe y *endo*-OMe, independientemente de su relativa contribución al equilibrio). Según lo explicado anteriormente, este equilibrio rápido requiere por lo menos dos movimientos conformacionales rápidos: **doble-flip** y **una rotación o ambas rotaciones** (tabla 12) de los anillo. Estos equilibrios se representan en la figura 54 a excepción de los cambios conformacionales menos probables, que requieren el paso del grupo OMe a través del espacio intra-anular (+II↔-IV y -II↔+IV).



Cuando se cambia el espaciador hexametileno por el espaciador 3-oxapentametileno, (olefina **OE**, figura 55) el tamaño del macrociclo se reduce de dieciocho átomos a diecisiete. En los espectros de RMN, esto se traduce en un ensanchamiento de las señales del anillo-D en el espectro de RMN ^1H . Esto indica que los movimientos rápidos (en la escala de tiempo de RMN) entre conformaciones se ven afectados por esta pequeña disminución del espacio intra-macrocíclico. El ensanchamiento de estas señales requiere al menos dos movimientos lentos (o más exactamente un movimiento lento y uno intermedio en la escala de tiempo de RMN) de los tres posibles: **rotación del anillo-D**, **rotación del anillo-T** y **doble-flip**.

La **rotación intermedia del anillo-T**⁵⁴ produciría un promedio de las señales químicamente equivalentes del anillo-D, pero las conformaciones *exo*-OMe y *endo*-OMe generarían dos juegos de señales. La razón de observar un solo juego puede deberse a que: solamente una de las dos posibilidades contribuye al espectro o un segundo movimiento es rápido en la escala de tiempo de RMN (bien la **rotación del anillo-D**, bien el **doble-flip**).

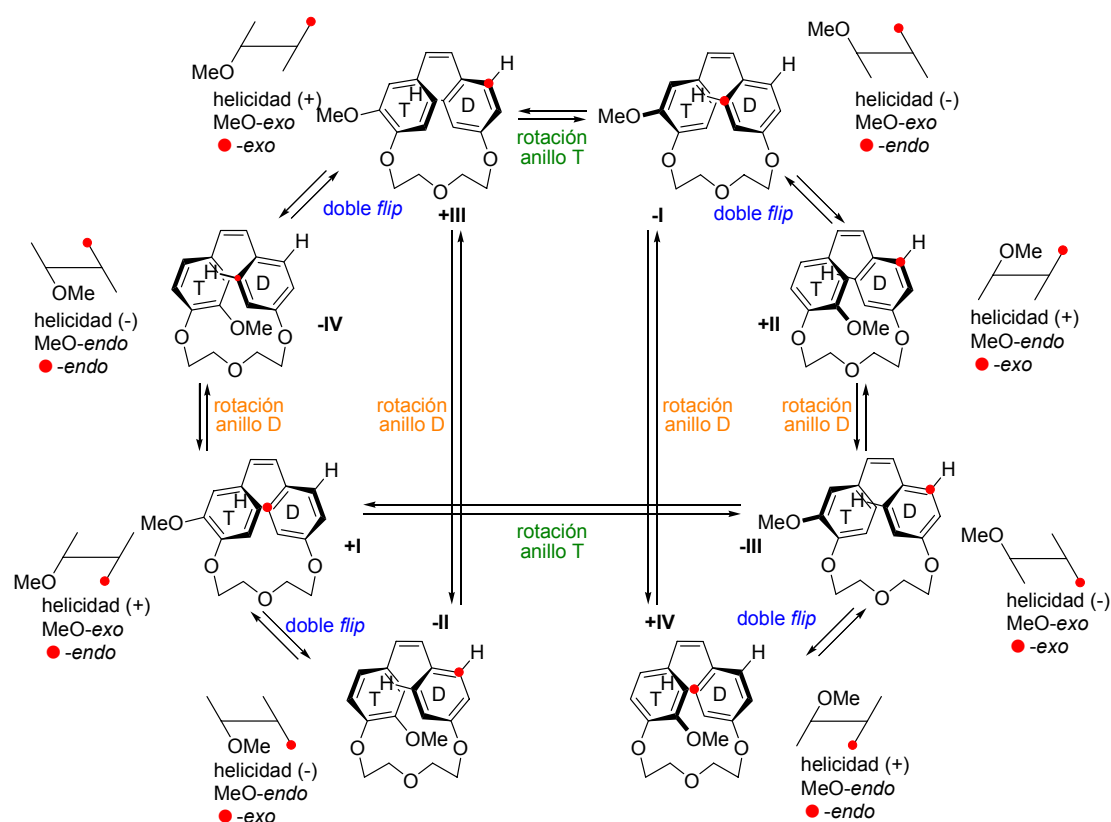
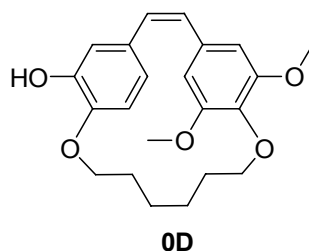


Figura 55. Equilibrio conformacional de la olefina **0E** (un anillo simétrico y espaciador 3-oxapentametileno). **Rotación** lenta o intermedia de los **anillos D y T** a través del macrociclo de 17 átomos y **rápido doble-flip** explicarían los espectros de RMN.

Por consiguiente, la pequeña diferencia de espacio intramacrocíclico entre los compuestos **0E** y **0F** es suficiente para disminuir la velocidad del paso de átomos a través de dicho espacio en la escala de tiempo de RMN. Por tanto, el paso de otros sustituyentes de mayor tamaño (grupos metoxilo) debe ser también lento en cualquier caso. Este hecho puede ser comprobado si se analizan compuestos con un anillo simétrico más voluminoso (**0D**).

⁵⁴ La rotación del anillo T no debe ser rápida, ya que el anillo D, menos restringido, también tendría rotación rápida, produciendo la interconversión rápida de las conformaciones ±I-±IV.



La figura 46 muestra la situación para el compuesto **0D** (que difiere de **0F** en la presencia de un anillo tetrasustituido, anillo-Q, en vez del anillo disustituido, anillo-D). Los espectros de RMN de **0D** muestran señales no ensanchadas y señales de doble intensidad para las posiciones químicamente equivalentes. Si aplicamos las equivalencias de $\pm I$ a $\pm III$ y $\pm II$ a $\pm IV$ vistas en la tabla 12 y consideramos improbables las rotaciones de los anillos que implican el paso de un grupo distinto de hidrógeno por el espacio intramacrocíclico, la **rotación del anillo-T** debe intercambiar las posiciones químicamente equivalentes del anillo-Q. La rotación del anillo-T no puede intercambiar por sí misma las disposiciones *endo* y *exo*, por lo que deberían ser observados dos juegos de señales, a menos que una de ellas sea minoritaria o el **doble-flip** sea también rápido. Igualmente, sólo un **doble-flip** rápido no explicaría los espectros, ya que siempre habría un metoxilo del lado del OH y otro del contrario.

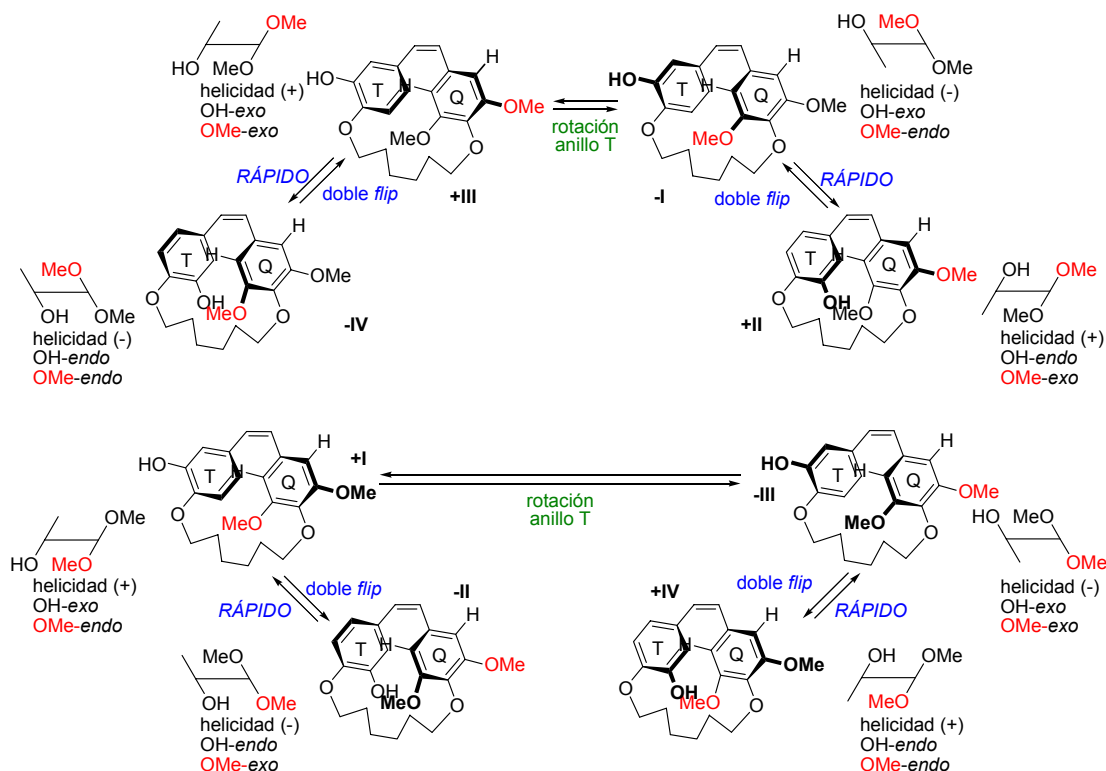
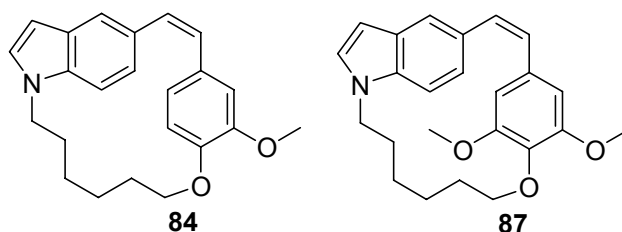


Figura 56. Equilibrio conformacional de la olefina **0D** (un anillo simétrico tetrasustituido, un anillo asimétrico trisustituido y espaciador hexametilénico). **Doble-flip** y **rotación del anillo-T** rápidos, pasando los átomos de H a través del espacio intra-macroscíclico explican que las posiciones químicamente equivalentes aparezcan como un promedio en los espectros de RMN.

En resumen, los espectros observados podrían explicarse mediante cambios **dobles flip** rápidos y **rotaciones** rápidas **de los anillos** cuando los átomos de hidrógeno pasan a través de un macrociclo de 18 átomos, siendo lentos o intermedios los giros cuando el macrociclo es de 17 átomos. En cualquier caso, el paso de sustituyentes más voluminosos a través del macrociclo debe estar impedido.

III.4.A.1.c. Olefinas macrocíclicas con un resto indolilo. Análisis conformacional de **84** y **87**.



En el caso de las olefinas indólicas **84** y **87**, la situación observada y el análisis presentan pocas variaciones. El compuesto **87** se puede considerar como análogo de **0D** con un anillo de indol en vez del anillo trisustituido y el compuesto **84**, en el que se ha eliminado un metoxilo del anillo tetrasustituido, es una versión aún menos simétrica, con dos anillos trisustituidos. Análogamente a **0D-F**, en los compuestos **84** y **87** hay ocho posibles conformaciones $\pm I$ - $\pm IV$ (Figuras 57 y 58), que pueden interconvertirse mediante la **rotación de los dos anillos** y el **dobles flip**. Las rotaciones indicadas mediante flechas de menor intensidad corresponden a giros más improbables, debido a que requieren el paso de un grupo metoxilo a través del espacio intra-anular o una elongación inalcanzable del espaciador.

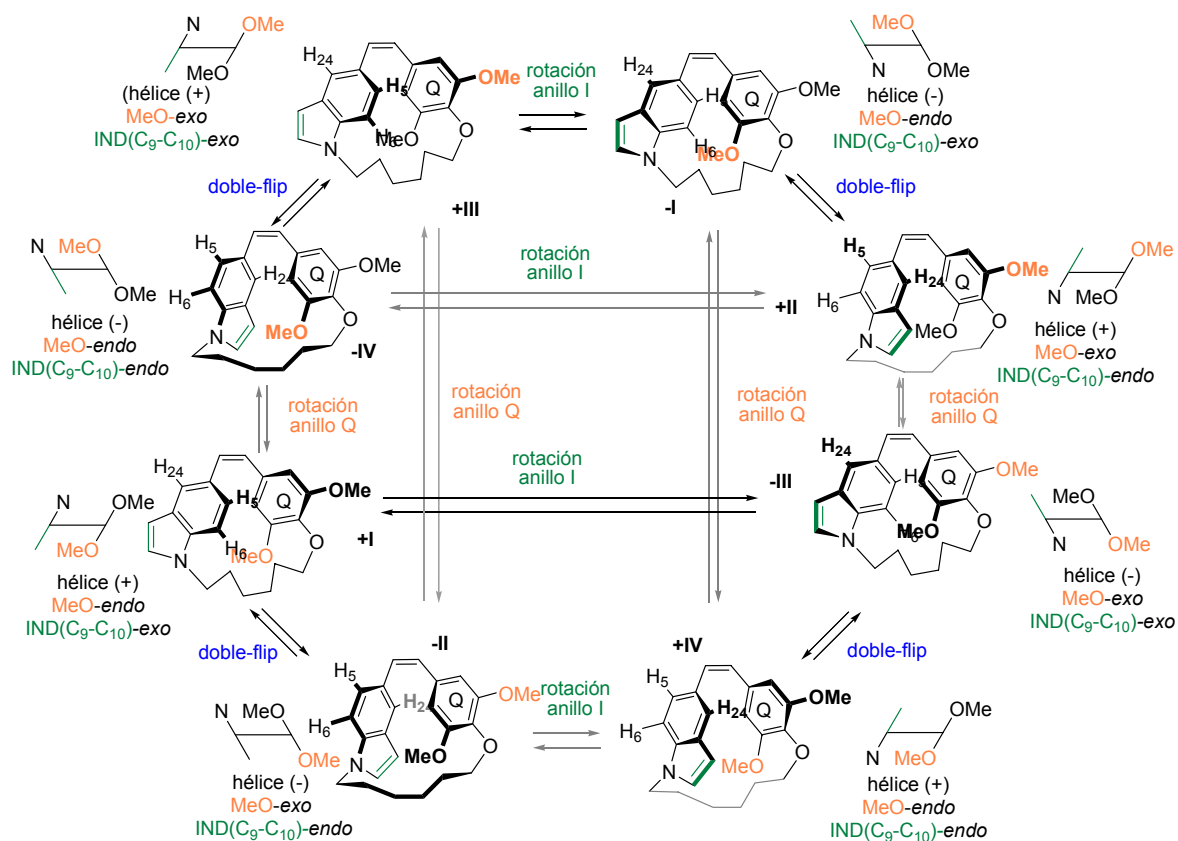


Figura 57. Equilibrio conformacional de la olefina **87**. La rotación del indol requiere el paso de H-5 y H-6 a través del espacio interno del macrociclo. La rotación del fenilo es altamente improbable ya que requiere el paso de un grupo metoxilo por el espacio intra-anular.

El compuesto **87** (Figura 57) posee un resto fenilo simétrico que hace que las conformaciones +I y +III sean idénticas al igual que las de sus enantiómeros -I y -III. Del mismo modo +II y +IV son iguales y sus enantiómeros -II y -IV también. Sin embargo, en el compuesto **84**, los dos anillos son asimétricos.

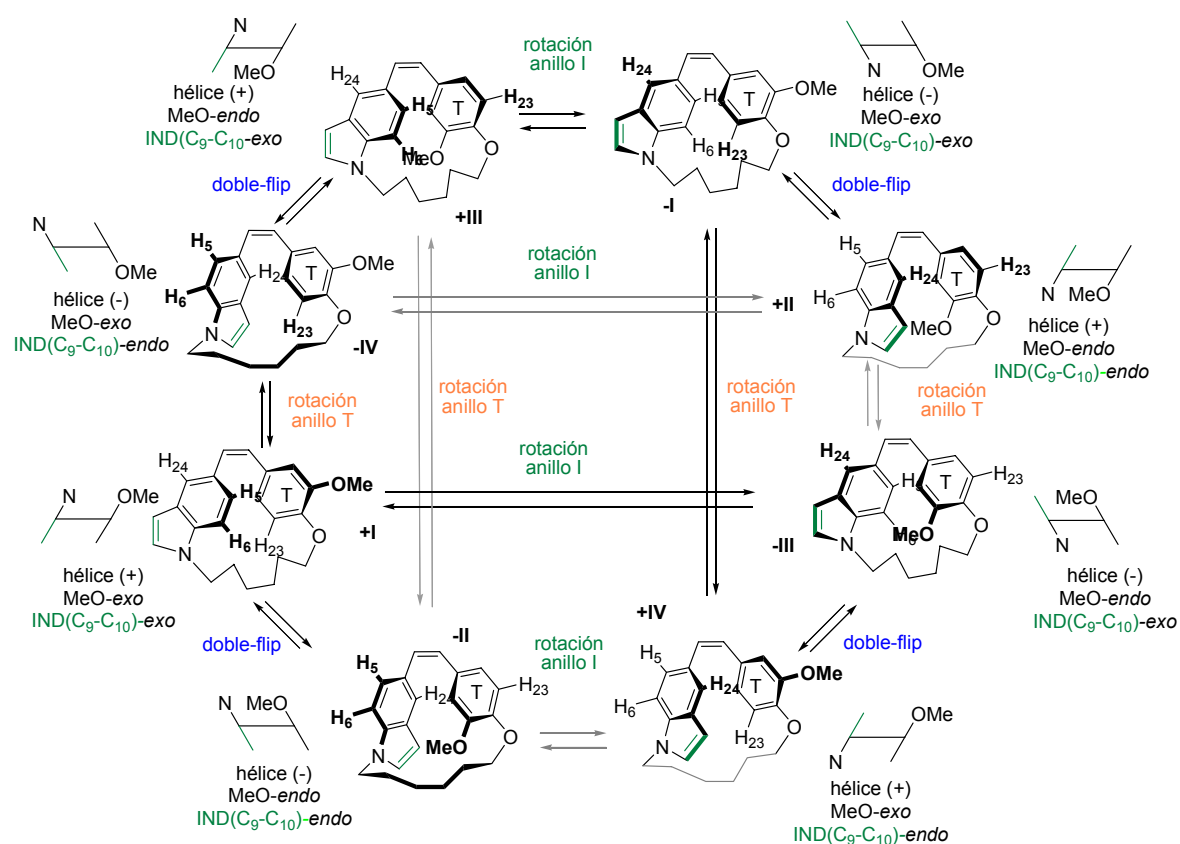


Figura 58. Equilibrio conformacional de la olefina **84**. La rotación del indol requiere el paso de H-5 y H-6 a través del espacio interno del macrociclo. La rotación del fenilo requiere el paso de H-22 y H-23 por el espacio intra-anular (en los intercambios de **-I** ↔ **+IV** y **-IV** ↔ **+I**) o el paso del grupo metoxilo (en los intercambios de **+II** ↔ **-III** y **+III** ↔ **-II**), siendo esta última rotación altamente improbable.

III.4.A.2 Estudios de mecánica molecular y dinámica molecular de las olefinas **84** y **87**.

III.4.A.2.a Mecánica molecular

La rigidez introducida en el sistema por el anillo de indol puede hacer que algunas de las conformaciones consideradas en el caso de los compuestos **0D-F**, no sean accesibles, por lo que no habría que tener en cuenta en la discusión conformacional algunas de las representadas en las figuras 57 y 58. En concreto, la inspección de los modelos moleculares planteaba dudas sobre la estabilidad de las conformaciones en las que el enlace N-espaciador adopta una disposición *exo* (\pm II y \pm IV). Con el fin de establecer las conformaciones accesibles a los compuestos **84** y **87** se llevó a cabo una búsqueda conformacional (Monte Carlo)⁵⁵ utilizando mecánica molecular (campo de fuerzas MM3 con cloroformo como disolvente).⁵⁶

En las conformaciones de mínima energía calculadas, se midieron varios ángulos diedros que permitían su asignación a los grupos conformacionales \pm I- \pm IV anteriormente definidos (figuras 57 y 58). Los diedros utilizados para el compuesto **84** se definen en la siguiente figura. Para el compuesto **87** se emplearon diedros equivalentes.

⁵⁵ a) Howard, A. E.; Kollman, P. A. An analysis of current methodologies for conformational searching of complex molecules. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1669-1675. b) Saunders, M.; Houk, K. N.; Wu, Y-D.; Still, C. W.; Lipton, J. M.; Chang, G.; Guidal, W. C. Conformations of Cycloheptadecane. A Comparison of Methods for Conformational Searching. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1419-1427.

⁵⁶ a) Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J. H. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8551-8566. b) Lii, J. H.; Allinger, N. L. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 2. Vibrational frequencies and thermodynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8566-8576. c) Lii, J. H.; Allinger, N. L. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 3. The van der Waals' potentials and crystal data for aliphatic and aromatic hydrocarbons *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8576-8582.

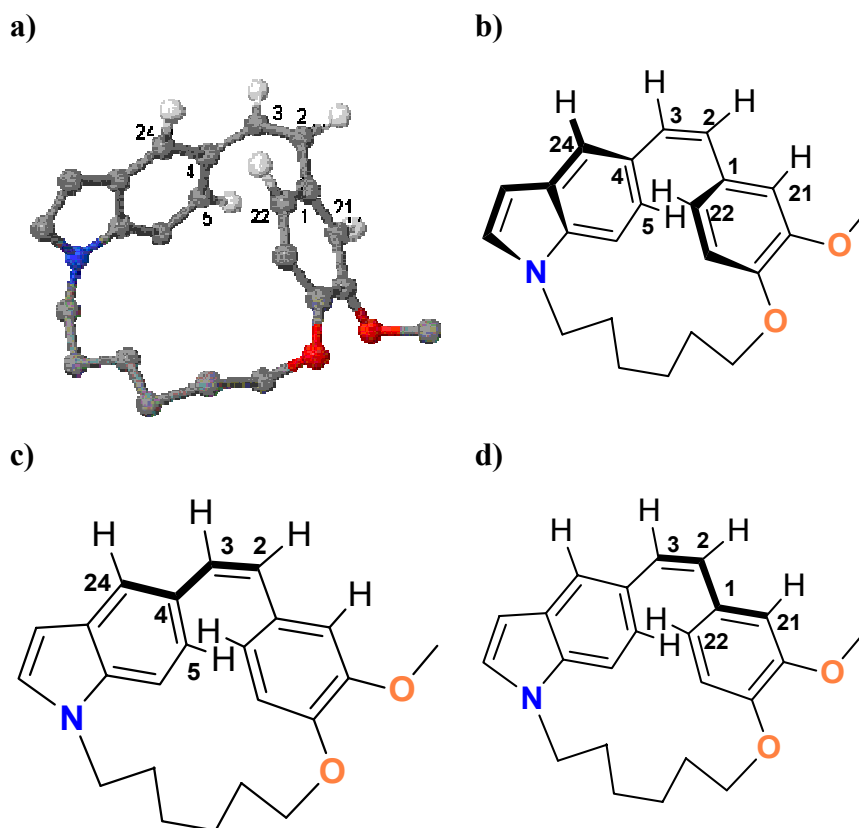


Figura 59. Visualización de los diedros empleados en la asignación de las conformaciones de mínima energía calculadas $\pm I \pm IV$. Las figuras superiores se corresponden con la representación tridimensional (a) y bidimensional (b) de la conformación $-I$ del compuesto **84**. En las figuras inferiores se han marcado, sobre dicha conformación, los ángulos diedros utilizados. En c se indican los átomos empleados en la medición del ángulo diedro (DI) que forma el indol con el puente olefinico, mientras que en d se indican los átomos empleados para medir el ángulo formado entre el dicho puente y el anillo fenilo (DT).

En los estudios de dinámica molecular,⁵⁷ que se describen más adelante, se observa cierta pérdida de la planaridad de los anillos aromáticos. Esto podría implicar que la consideración del diedro 24-4-3-2 (DI) o del diedro 5-4-3-2 llevara a resultados diferentes. Para evitarlo, se promedió el valor del diedro 24-4-3-2 (DI) con el del complementario a 5-4-3-2. Lo mismo se aplicó para 21-1-2-3 (DT) y 22-1-2-3. En ambos casos, el valor del diedro considerado para la asignación conformacional y la discusión que sigue, corresponde al valor del diedro indicado en primer lugar y resaltado en negrita en la figura.

⁵⁷ Hudson, B. D.; George, A. R.; Ford, M. G.; Livingstone D. J. Structure-activity relationships of pyrethroid insecticides. Part 2. The use of molecular dynamics for conformation searching and average parameter calculation. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 191-201.

Una vez medidos los diedros indicados, se determinó la helicidad correspondiente a cada conformación (ver figura 60). Para ello, se asignó una helicidad negativa (-) para los anillos con valores de los diedros DI o DT (flechas verdes) mayores de 90 o entre 0 y -90°. Si la helicidad para ambos anillos era coincidente, se clasificaba la conformación con dicha helicidad. Si, por el contrario, era discordante, se marcaba la conformación como no correspondiente a los grupos considerados inicialmente.

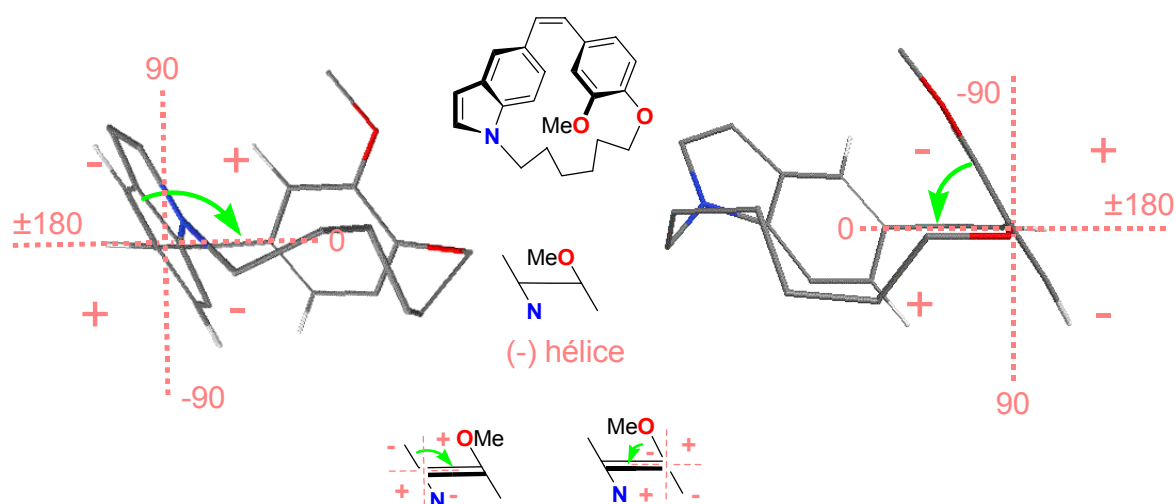


Figura 60. Representación del compuesto **84** en la conformación que se encuentra en el centro de la figura desde dos puntos de vista para que se visualicen los ángulos diedros medidos para cada anillo (IND a la izquierda, DM a la derecha). Los ángulos están marcados con las flechas verdes (desde el plano del anillo al plano del doble enlace). En la parte inferior de la figura se muestra la representación esquemática de esta conformación (la línea horizontal representa el doble enlace, las líneas oblicuas el plano de los anillos y las flechas verdes, nuevamente, los ángulos medidos).

Las conformaciones de mínima energía se clasificaron en las categorías I-IV en función del valor de los ángulos diedro medidos y de acuerdo con los siguientes criterios:

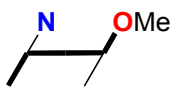
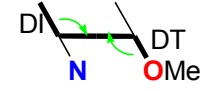

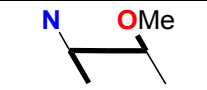

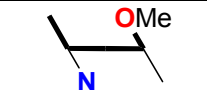
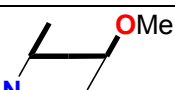
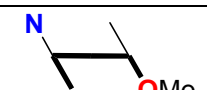
Conformación	Hélice +	Representación	Hélice -	Representación
I	DI < -90 DT < -90		90 < DI 90 < DT	
II	0 < DI < 90 0 < DT < 90		-90 < DI < 0 -90 < DT < 0	
III	DI < -90 0 < DT < 90		90 < DI -90 < DT < 0	
IV	0 < DI < 90 DT < -90		-90 < DI < 0 90 < DT	

Tabla 13. Rango de valores de los ángulos DI y DT para cada conformación I-IV y helicidad (aunque en la tabla se indiquen valores de 0, 90° y 180° para que resulte más clara la asignación de los cuadrantes, en realidad se han empleado rangos de valores diez grados mayores y menores, como se explica más adelante, al considerar que las conformaciones con diedros muy cercanos a esos valores pueden representar situaciones intermedias entre categorías). Se incluye una representación gráfica de cada conformación en las columnas 3 y 5.

Las conformaciones con helicidad de los dos anillos aromáticos no coincidente o aquellas en las que uno o ambos anillos presentan un diedro cercano ($\pm 10^\circ$) al cambio de categoría (0° , $\pm 90^\circ$, $\pm 180^\circ$), se han incluido en categorías adicionales:

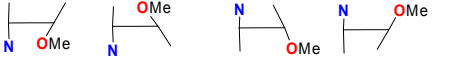
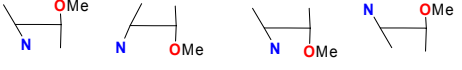
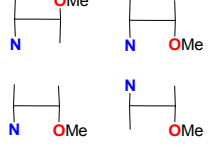
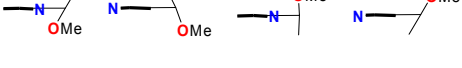
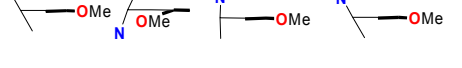
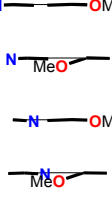
Valores de los diedros	Ejemplos	Tipo de conformación
$80 < DI < 100$ ó $-100 < DI < -80$		<i>Flip del indol</i>
$80 < DT < 100$ ó $-100 < DT < -80$		<i>Flip del trisustituido</i>
$80 < DI < 100$ ó $-100 < DI < -80$ y $80 < DT < 100$ ó $-100 < DT < -80$		Doble <i>flip</i>
$DI < -170$ ó $DI > 170$ ó $-10 < DI < 10$		Rotación del indol
$DT < -170$ ó $DT > 170$ ó $-10 < DT < 10$		Rotación del trisustituido
$DI < -170$ ó $DI > 170$ ó $-10 < DI < 10$ y $DT < -170$ ó $DT > 170$ ó $-10 < DT < 10$		Doble rotación (cero ring <i>flip</i>)

Tabla 14. Valores de los ángulos diedros (columna de la izquierda) que definen cada uno de los estados intermedios considerados (columna de la derecha) y representación gráfica de alguna de las posibles conformaciones (columna central).

La aplicación de estas reglas al resultado de las búsquedas conformacionales realizadas para los compuestos **84** y **87** permite obtener gráficas en las que asignar y analizar las conformaciones. Además, el mismo procedimiento se ha aplicado para **0D**, **0E** y **0F** con el fin de facilitar la comparación de las distintas series.

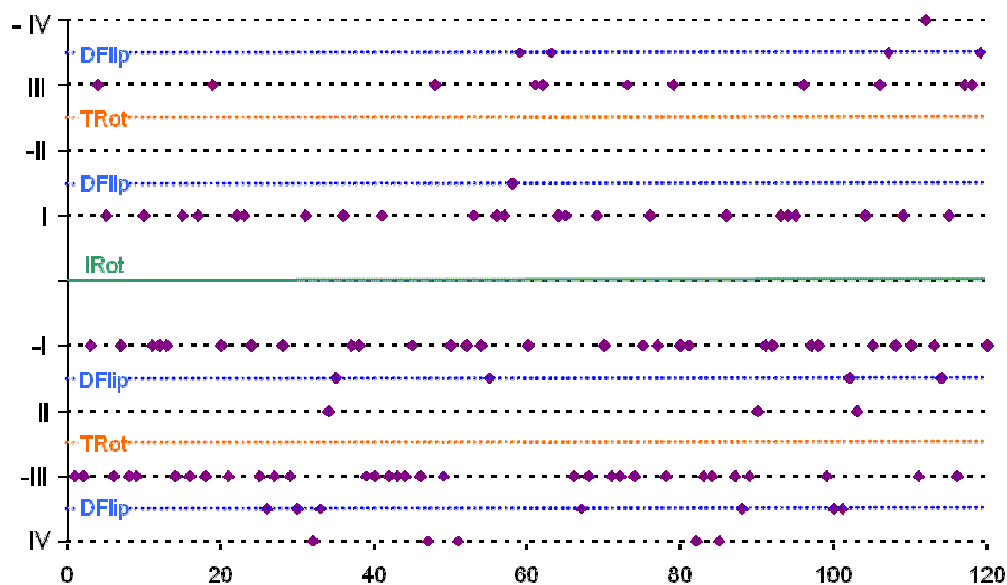


Figura 61.

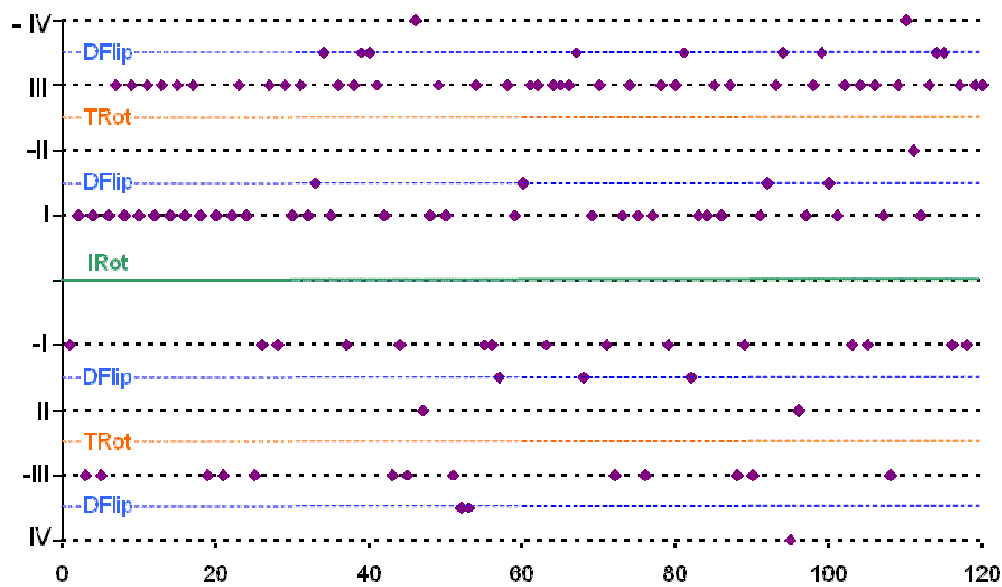


Figura 62.

Representaciones gráfica de las conformaciones de mínima energía calculadas para los compuestos **84** (figura 61, arriba) y **87** (figura 62, abajo). Cada punto indica una conformación, de menor a mayor energía (de izda. a dcha.). Las líneas horizontales indican los grupos conformacionales definidos (-IV, III, -II, I, -I, II, -III y IV, de arriba abajo) y los movimientos por los cuales se interconvierten entre ellos (**Doble flip**, **Rotación del anillo T o Q**, **Doble flip**, **Rotación del anillo I**, **Doble flip**, **Rotación del anillo T o Q** y **Doble flip**, de arriba abajo).

Los resultados obtenidos al analizar las gráficas se resumen en la siguiente tabla, donde se indica a que grupo pertenecen las conformaciones de mínima energía encontradas para cada compuesto, la diferencia de energía de cada una de ellas respecto al mínimo global y el número de veces que se ha encontrado dicha conformación tras 1000 etapas y con una diferencia de energía inferior a 5 kcal / mol respecto al mínimo global.

	I	-I	II	-II	III	-III	IV	-IV	Otras
84	0,6 (8)	0,3 (9)	2,1 (5)	- (0)	0,4 (15)	0 (4)	2,3 (7)	4,5 (8)	Doble <i>flip</i>
87	0,3 (6)	0 (5)	2,4 (5)	1,8 (7)	0,7 (4)	0,3 (4)	3,2 (5)	1,9 (2)	Doble <i>flip</i>
0D	0 (12)	0,7 (3)	2,7 (6)	1,7 (4)	0,6 (2)	0 (10)	2,7 (3)	1,7 (7)	Doble <i>flip</i>
0E	0,7 (55)	1,2 (20)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	2,3 (14)	0 (46)	Doble <i>flip</i>
0F	0 (22)	0,9 (8)	0,5 (23)	1,0 (10)	0,9 (5)	2,6 (7)	3,3 (2)	2,9 (3)	Doble <i>flip</i>

Tabla 15. Resultados del análisis conformacional para los compuestos **84**, **87**, **0D**, **0E** y **0F**. En la parte superior de cada casilla se indica la mínima energía de cada grupo conformacional respecto al mínimo global (sombreado oscuro). Mientras que en la parte inferior se indica el número de veces que se ha encontrado la conformación de mínima energía para cada grupo conformacional. En la columna de la derecha se indica si se han encontrado otras conformaciones intermedias a las definidas. Las conformaciones son iguales por parejas, $\pm I = \pm III$ y $\pm II = \pm IV$, para los compuestos **87** y **0D-F**, mientras que para **84** I-IV son todas diferentes.

La diferencia de energía entre conformaciones idénticas o imágenes especulares nos informa del error intrínseco del método. Este error puede tener dos orígenes:

- El error asociado a los campos de fuerza utilizados.⁵⁸
- La dificultad de encontrar el mínimo a partir de las conformaciones tensionadas generadas en la búsqueda conformacional, para sistemas en los que las rotaciones de los enlaces están muy interrelacionadas (como es el caso de macrociclos sustituidos).⁵⁵

⁵⁸ Gundertofte, K.; Liljefors, T.; Norrby, P. O.; Pettersson, I. A Comparison of Conformational Energies Calculated by Several Molecular Mechanics Methods. *J. Comput. Chem.* **1996**, *4*, 429-449.

La segunda limitación puede superarse en cierta manera mediante el empleo de diferentes métodos de muestreo conformacional,⁵⁵ como la dinámica molecular⁵⁹ que se discutirá más adelante. En general, se observa que la diferencia de energía entre parejas de conformaciones enantiómeras es de hasta 2,3 kcal / mol, aunque en la mayoría de los casos se mantienen por debajo de 1 kcal / mol.

Para el compuesto **84**, las conformaciones de mínima energía se corresponden con conformaciones de tipo I y III, mientras que las conformaciones de tipo II y IV parecen encontrarse menos pobladas. Para el compuesto **87**, como se ha indicado anteriormente, las conformaciones tipo I y III son iguales entre sí e igualmente ocurre con las tipo II y IV, debido a la naturaleza simétrica del anillo tetrasustituido, por lo que deben considerarse conjuntamente, aunque se computen por separado. De cualquier modo, se observa que ambos tipos de conformaciones, I/III y II/IV, presentan diferencias en energía que hacen que todas deban ser tenidas en cuenta. La estructura obtenida por difracción de rayos X de cristales de la olefina **87** muestra una conformación en el estado sólido correspondiente a las conformaciones -I/-III, como se muestra en la figura 63. Para los compuestos **0D-F** se observa una situación similar a la descrita para **84**. Sin embargo, las conformaciones tipo II/IV presentan distintos grados de participación. En los compuestos **84** y **87**, al igual que ocurre para **0D-F**, se observa la presencia de conformaciones diferentes de las I-IV. En concreto, se observan conformaciones que corresponden a los **doble flips**.

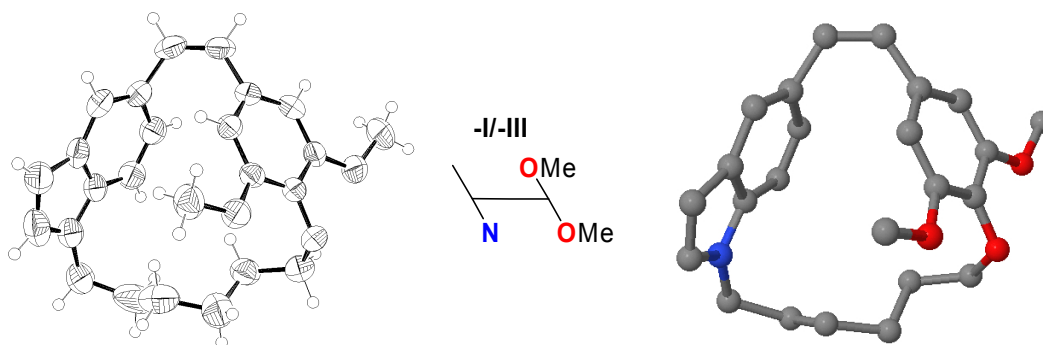
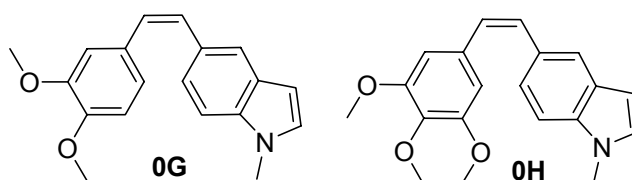


Figura 63. Estructura obtenida por difracción de rayos X de cristales de la olefina **87**.

⁵⁹ Wilson, S. R.; Cui, W.; Moskowitz, J. W.; Schmidt, K. E. Conformational Analysis of Flexible Molecules: Location of the Global Minimum Energy Conformation by the Simulated Annealing Method. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4373-4376.

III.4.A.2.b. Dinámica molecular.

Con el fin de estudiar las transiciones entre las conformaciones de los compuestos **84** y **87**, se han llevado a cabo estudios de dinámica molecular.⁵⁷ Esta metodología permite, además, llevar a cabo un muestreo conformacional complementario al realizado mediante el Monte Carlo.⁵⁹ Las simulaciones se han llevado a cabo durante 3 ns a distintas temperaturas (típicamente 300, 600, 1200 y 1500 K), empleando las mismas condiciones que las descritas para las búsquedas conformacionales utilizando Monte Carlo. Adicionalmente, y con el fin de facilitar el análisis de los resultados, se han llevado a cabo simulaciones análogas a las descritas para sistemas modelo (**0G** y **0H**) que carecen del espaciador.



Los resultados de las dinámicas moleculares se han analizado de la misma forma que las búsquedas conformacionales, asignando las conformaciones a los tipos $\pm I$ - $\pm IV$, más los que corresponden a situaciones de transición entre ellas (como se ha descrito anteriormente). Además, se ha analizado la trayectoria de forma secuencial, comparando cada conformación con la que le sigue en la simulación. El análisis de la forma en que ocurren las transiciones entre conformaciones permite la asignación de la ruta más simple posible (por ejemplo, un tránsito de $+III$ a $-I$ se considera producido por una rotación del anillo de indol -**IRot**-). Si con un único paso no es posible efectuar la interconversión, el mecanismo de transición no se indica. Cabe destacar que, a medida que aumenta la temperatura, la cantidad de conformaciones que corresponden a tipos distintos de $\pm I$ - $\pm IV$ se incrementa considerablemente.

Los procesos que determinan el aspecto de los espectros de RMN (tanto de protón como de carbono) son inaccesibles a simulaciones de dinámica molecular, ya que ocurren en una escala de tiempo de los microsegundos o superior. Pese a ello, las simulaciones de dinámica molecular permiten obtener una idea bastante fidedigna de la facilidad relativa con la que ocurren dichos procesos, facilitando notablemente la interpretación de los espectros. A bajas temperaturas los procesos ocurren demasiado lentamente como para que su frecuencia sea lo suficientemente alta como para observarlos durante simulaciones que duran 3 ns. Por ello, se ha procedido a incrementar progresivamente la temperatura de la simulación para facilitar la superación de barreras energéticas inaccesibles a menores temperaturas, puesto que procesos que ocurren con bajas frecuencias a temperatura ambiente pueden ser observables a 1500 K.

La dinámica molecular a 300K de los análogos no macrocíclicos (**0H** y **0G**) de **84** y **87** (figuras 64a y b) muestra que a temperatura ambiente todas las conformaciones son accesibles durante la simulación. Además se observan tanto conformaciones con helicidad positiva como negativa. Para el compuesto con dos metoxilos (**0G**), el grupo conformacional más poblado es el \pm III, de acuerdo con lo descrito anteriormente para los análogos macrocíclicos no indólicos, aunque \pm I y \pm IV también están ampliamente representados. Las conformaciones tipo II son mucho menos frecuentes. De acuerdo con lo que se indica en la tabla 16, la distribución observada se corresponde con una situación dominada por la preferencia del metoxilo a adoptar una disposición *endo*, siendo menos importante la disposición del anillo de indol. Además, la disposición *endo* simultánea de los dos sustituyentes parece ser muy desfavorable.

Preferencias conformacionales	Conformaciones Preferidas	Conformaciones Intermedias	Conformaciones Desfavorecidas	Conformaciones Muy Desfavorecidas
MeO <i>endo</i>	III ~ II		I ~ IV	
IND <i>exo</i>	III ~ I		II ~ IV	
MeO <i>endo</i> IND <i>exo</i>	III	I ~ II	IV	
Observado	III		I ~ IV	II

Tabla 16. Análisis de las posibles preferencias de los sustituyentes para adoptar disposiciones *endo* o *exo* y el efecto que dicha preferencia tendría sobre las conformaciones globales del análogo acíclico de la olefina **84 (0G)**. Se indican las conformaciones preferidas y desfavorecidas en los supuestos de que la preferencia conformacional sea la indicada en la columna de la izquierda.

En el compuesto con tres metoxilos (**0H**) los tipos I y III son el mismo, así como los tipos II y IV, observándose un predominio de la primera pareja sobre la segunda. Esta observación está de acuerdo con lo propuesto anteriormente, ya que siempre hay un metoxilo *exo* y uno *endo* presentes, lo que elimina el dominio que éste ejercía sobre la preferencia conformacional. La única diferencia posible es ahora la disposición del anillo de indol, que en este caso prefiere adoptar la disposición *exo* (que equivale a la exclusión de dos disposiciones *endo* simultáneas).

A 1200K se observa un menor tiempo de residencia en cada tipo conformacional, como era de esperar. Este incremento en el número de transiciones facilita la ocupación de todos los tipos de conformaciones. A esta temperatura se observa un comportamiento muy similar de ambos compuestos.

En lo que respecta a las transiciones, en ambas simulaciones se observan rotaciones del anillo de indol, del anillo tri- o tetrasustituido y doble *flips*. Sin embargo, el compuesto con tres metoxilos (**0H**) aparentemente tiene una mayor dificultad para completar los giros del anillo de indol (cambios de la mitad superior a la inferior y viceversa del diagrama A, que perduran un tiempo).

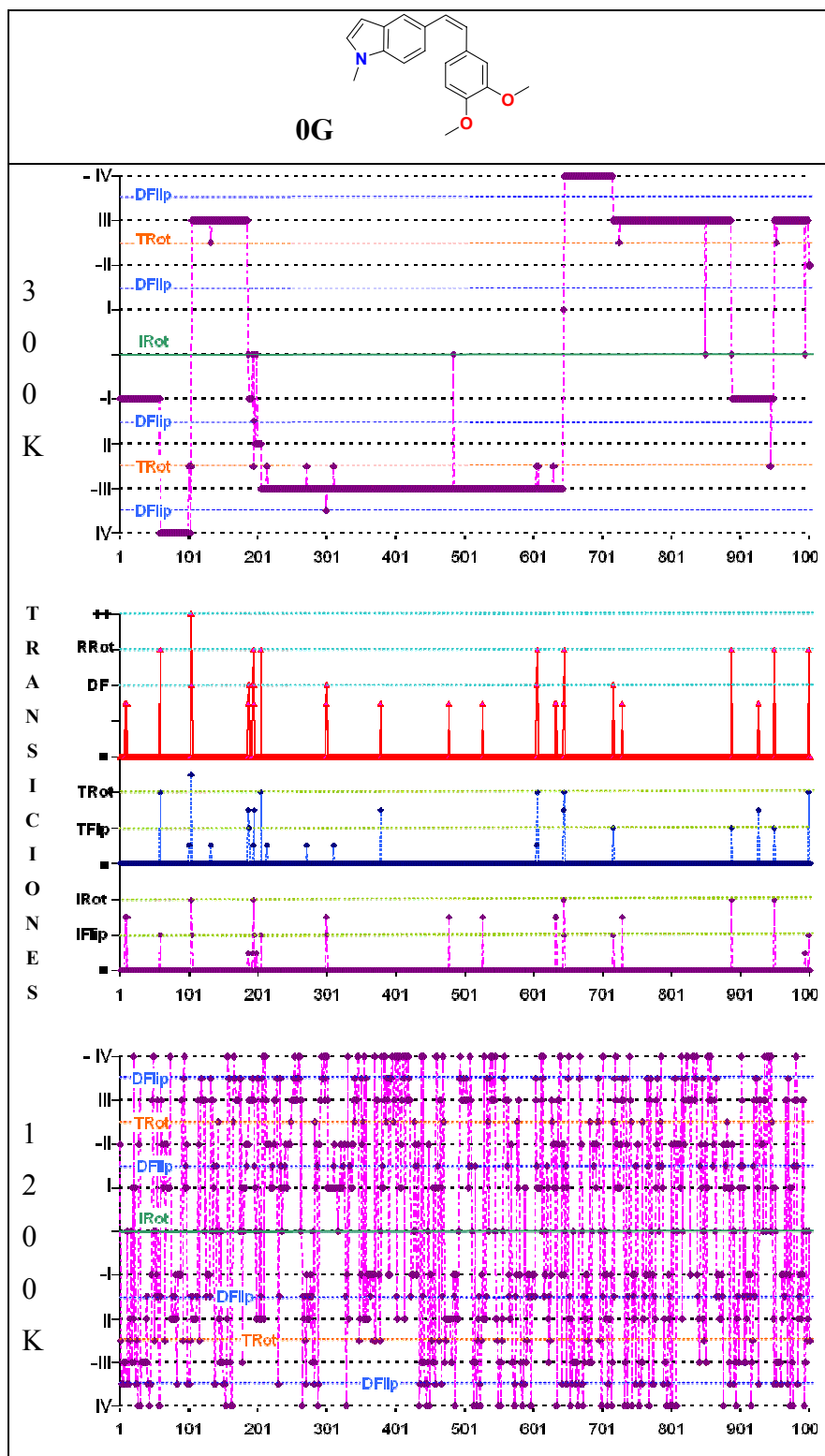


Figura 64a. Gráficas resumen de las dinámicas moleculares del análogo no macrocíclico de **84**, **0G**. La gráfica superior muestra los grupos conformacionales a los que pertenecen las conformaciones obtenidas de la dinámica molecular a 300K, mientras que la inferior los muestra para la dinámica a 1200K. En la gráfica central se indican las transiciones sencillas asignadas a las interconversiones en la dinámica molecular a 300: En rojo las de los dos anillos (sin cambios: =, rotación de alguno de los anillos: RRoT, doble *flip*: DF y transiciones complejas:++); en azul las del fenilo y en morada las del indol (sin cambios: =, rotación de 1 anillo: IRot o TRot, *flip* de anillo: IFlip o TFlip). Los puntos entre categorías indican estados de transición de la categoría superior y los puntos de las gráficas azul o morada por encima de TRot o IRot indican transiciones complejas de ese anillo.

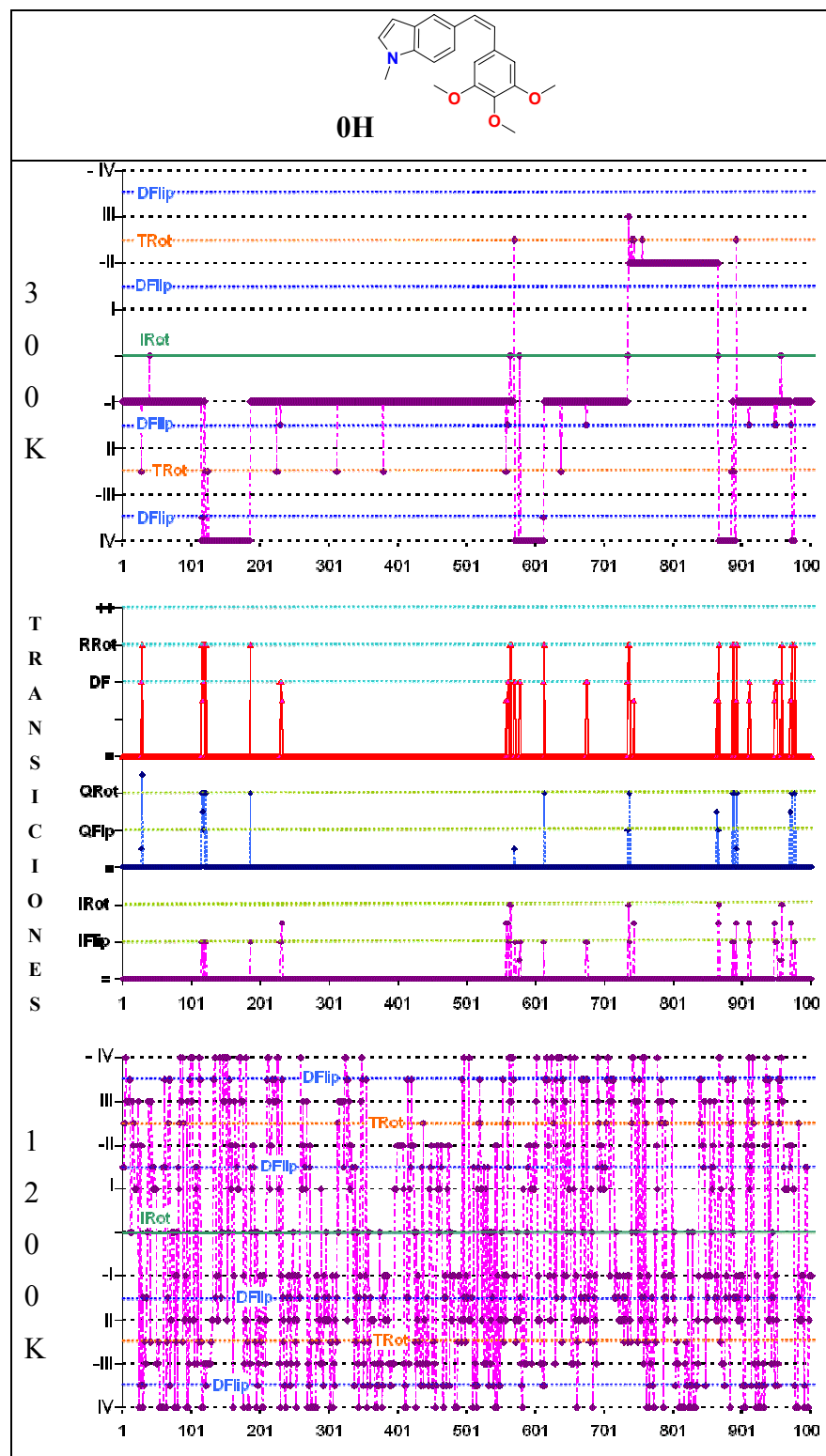


Figura 64b. Gráficas resumen de las dinámicas moleculares del análogo no macrocíclico de **87, 0H**. La gráfica superior muestra los grupos conformacionales a los que pertenecen las conformaciones obtenidas de la dinámica molecular a 300K, mientras que la inferior los muestra para la dinámica a 1200K. En la gráfica central se indican las transiciones sencillas asignadas a las interconversiones en la dinámica molecular a 300: En rojo las de los dos anillos (sin cambios: =, rotación de alguno de los anillos: RRoT, doble *flip*: DF y transiciones complejas: ++); en azul las del fenilo y en morado las del indol (sin cambios: =, rotación de 1 anillo: IRot o TRot, *flip* de anillo: IFlip o TFlip). Los puntos entre categorías indican estados de transición de la categoría superior y los puntos de las gráficas azul o morada por encima de TRot o IRot indican transiciones complejas de ese anillo.

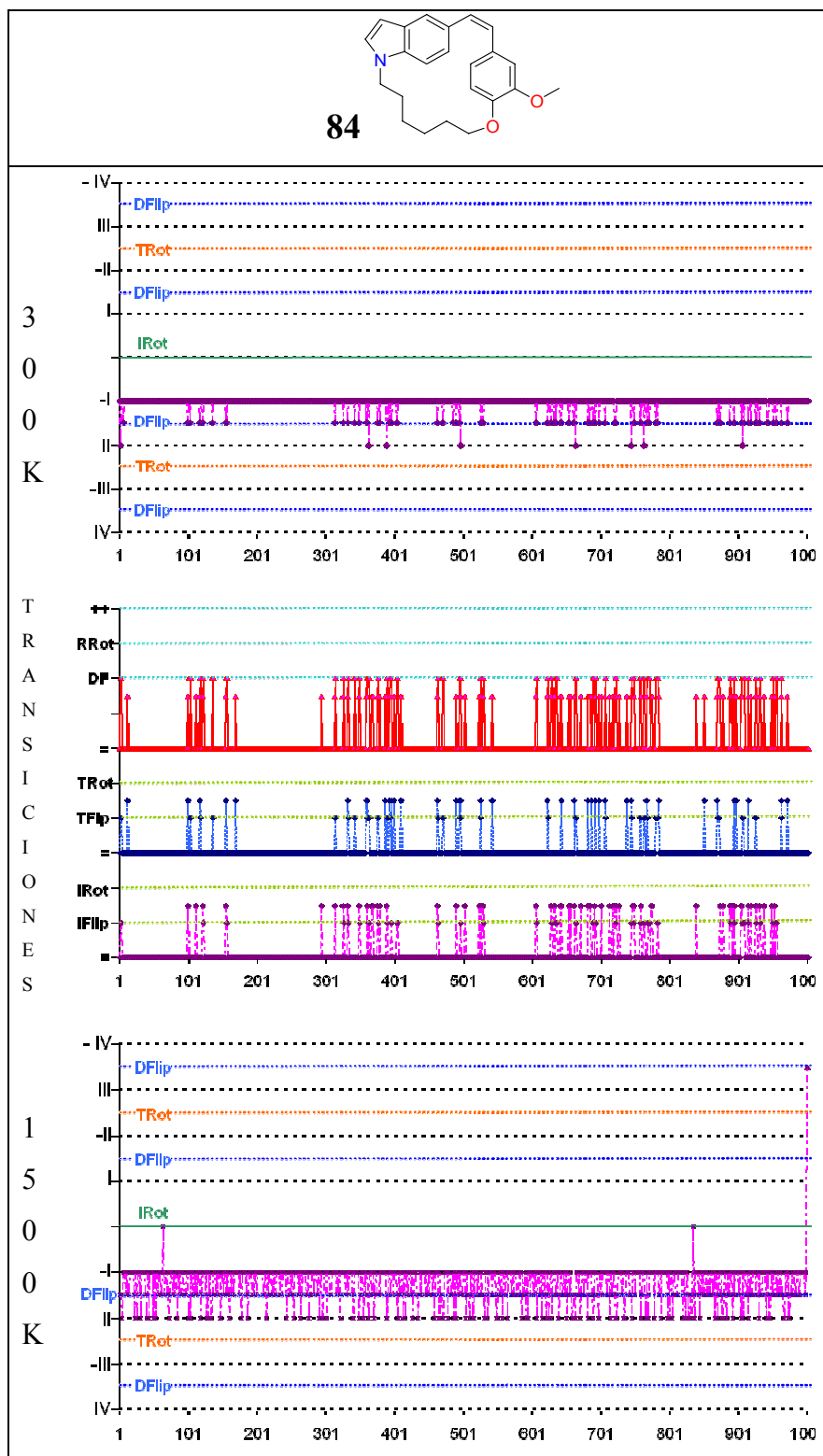


Figura 66a. Gráficas resumen de las dinámicas moleculares del compuestos **84**. La gráfica superior muestra los grupos conformacionales a los que pertenecen las conformaciones obtenidas de la dinámica molecular a 300K, mientras que la inferior los muestra para la dinámica a 1500K. En la gráfica central se indican las transiciones sencillas asignadas a las interconversiones en la dinámica molecular a 300: En rojo las de los dos anillos (sin cambios: =, rotación de alguno de los anillos: RRoT, doble *flip*: DF y transiciones complejas:++); en azul las del fenilo y en morado las del indol (sin cambios: =, rotación de l anillo: IRot o TRot, *flip* de anillo: IFlip o TFlip). Los puntos entre categorías indican estados de transición de la categoría superior y los puntos de las gráficas azul o morada por encima de TRot o IRot indican transiciones complejas de ese anillo.

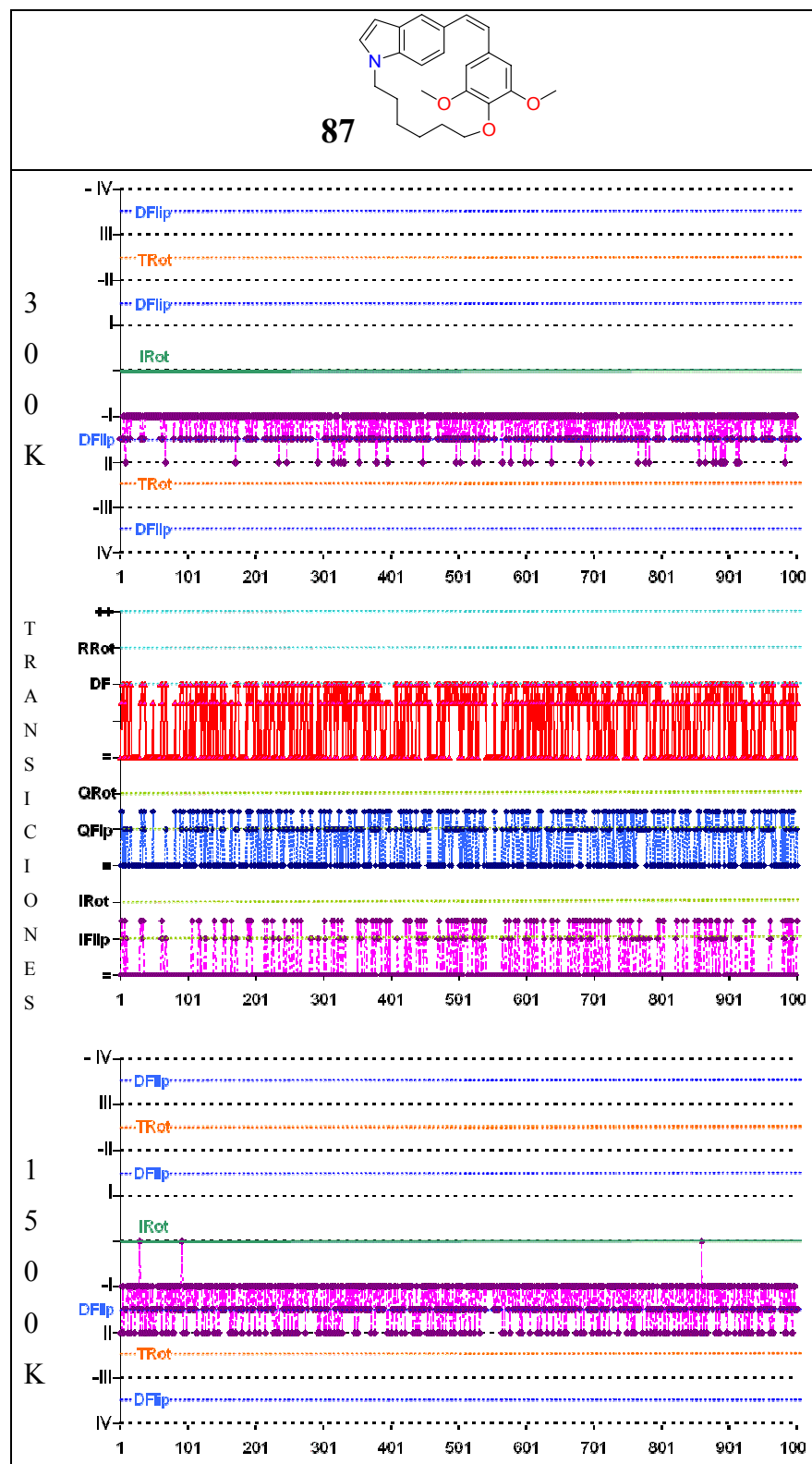


Figura 66b. Gráficas resumen de las dinámicas moleculares del compuestos **87** La gráfica superior muestra los grupos conformacionales a los que pertenecen las conformaciones obtenidas de la dinámica molecular a 300K, mientras que la inferior los muestra para la dinámica a 1500K. En la gráfica central se indican las transiciones sencillas asignadas a las interconversiones en la dinámica molecular a 300: En rojo las de los dos anillos (sin cambios: =, rotación de alguno de los anillos: RRoT, doble *flip*: DF y transiciones complejas:++); en azul las del fenilo y en morado las del indol (sin cambios: =, rotación de 1 anillo: IRot o TRot, *flip* de anillo: IFlip o TFlip). Los puntos entre categorías indican estados de transición de la categoría superior y los puntos de las gráficas azul o morada por encima de TRot o IRot indican transiciones complejas de ese anillo.

Las dinámicas moleculares a 300K, 1200K y 1500K (Figuras 66a y b) de **84** y **87** muestran sólo las conformaciones -I y +II, junto con numerosas conformaciones tipo **dobles flip** (en las que los planos de los dos anillos están perpendiculares al del doble enlace), que representan estados intermedios entre ellas. Esto indica que el espaciador reduce notablemente la flexibilidad conformacional de estos compuestos, permitiendo sólo con facilidad el **dobles flip**. Los resultados de las dinámicas moleculares no permiten analizar la estabilidad relativa de los tipos conformacionales para estos compuestos, al no alcanzarse una situación de equilibrio entre conformaciones.

Desde el punto de vista del análisis de las transiciones, al ser pequeñas las diferencias de energía entre conformaciones, el iniciar la simulación en una u otra conformación no debe tener un gran efecto en los tipos y frecuencias de las transiciones observadas.

Cuando se comparan los resultados obtenidos a la misma temperatura para los dos macrociclos, el compuesto **87** muestra mayor movilidad (figura 66b) que el **84** (Figura 66a). Como estos movimientos se asocian a giros de tipo **dobles flip**, éste parece verse facilitado en el compuesto con dos metoxilos. Una posible explicación es que el metoxilo adicional desestabilice las conformaciones -I de baja energía del compuesto **87** (al forzar siempre a situar un metoxilo hacia el interior del macrociclo) respecto al estado de transición, con los metoxilos dirigidos perpendicularmente al plano del doble enlace (y por tanto interaccionando más débilmente). En comparación, el compuesto **84** tiene menos interacción entre el metoxilo y el espaciador en -I, y este efecto desestabilizador disminuye menos entre la conformación -I y el estado de transición.

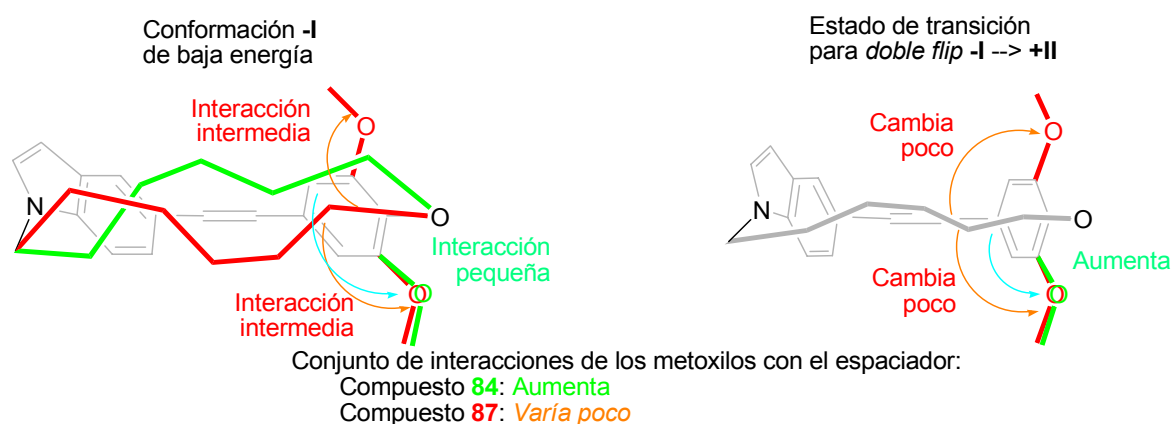


Figura 65. Representación de la interacción de los metoxilos con el espaciador para la conformación -I y el estado de transición -I→II para los compuestos **84** y **87**.

Con el fin de discriminar entre los efectos del espaciador y los debidos a la rigidez introducida en el sistema por el anillo de indol, hemos llevado a cabo dinámicas moleculares iguales a las descritas para **84** y **87** sobre **0D**, **0E** y **0F**. Los resultados para **0D** y **0F** (ambos con espaciador hexametileno) son muy similares, por lo que sólo se muestran los de éste último y **0E** (espaciador 3-oxapentametileno). Al igual que en el caso anterior, a 300K sólo se aprecia una conformación muy mayoritaria (en este caso -III, la conformación inicial) y una minoritaria (IV), además de la conformación de tipo **dobles flip** intermedia entre ambas.

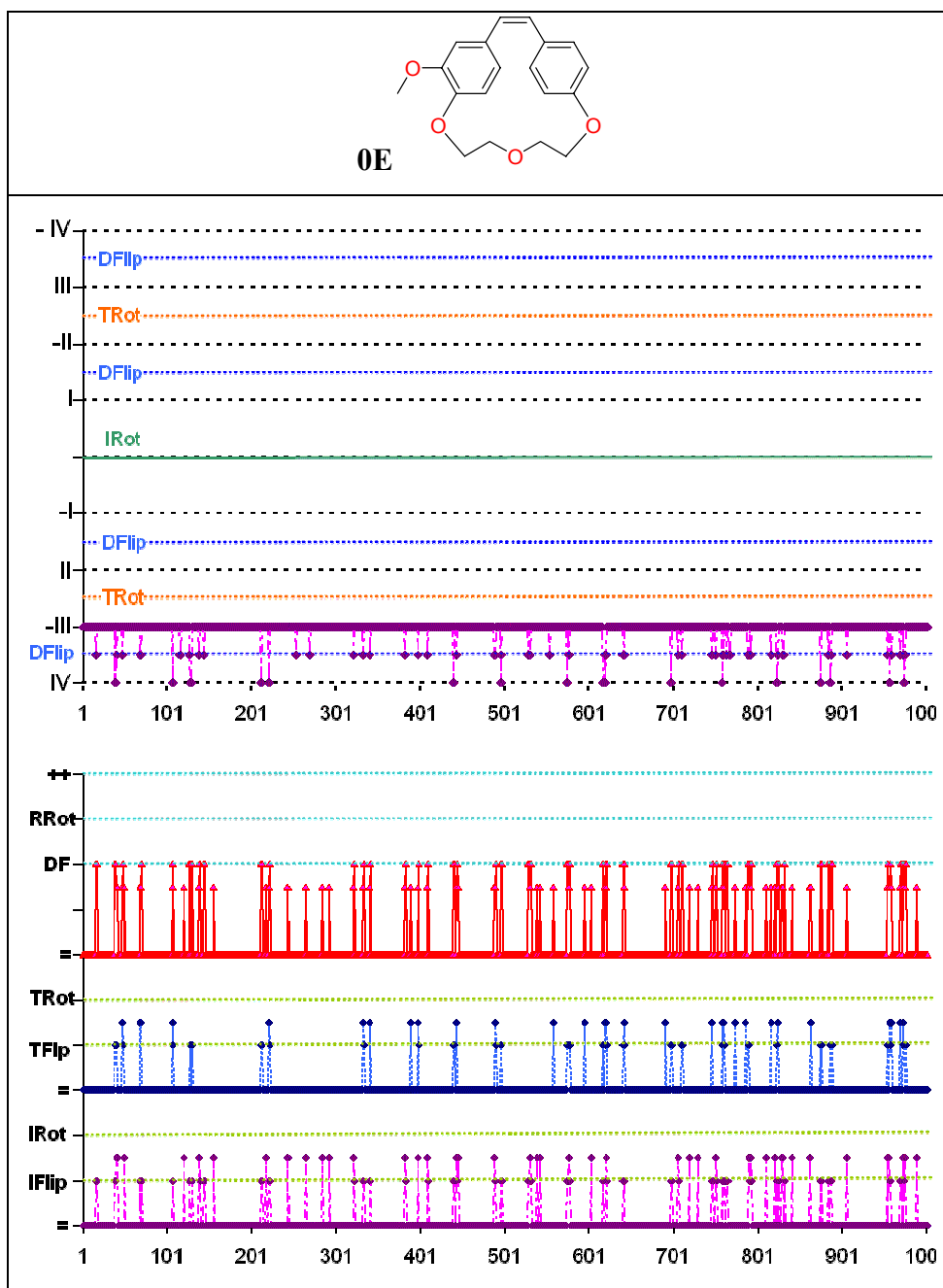


Figura 67a. Conformaciones (gráfica superior) y transiciones observadas (gráfica inferior) en la dinámica molecular a 300K del compuesto **0E**.

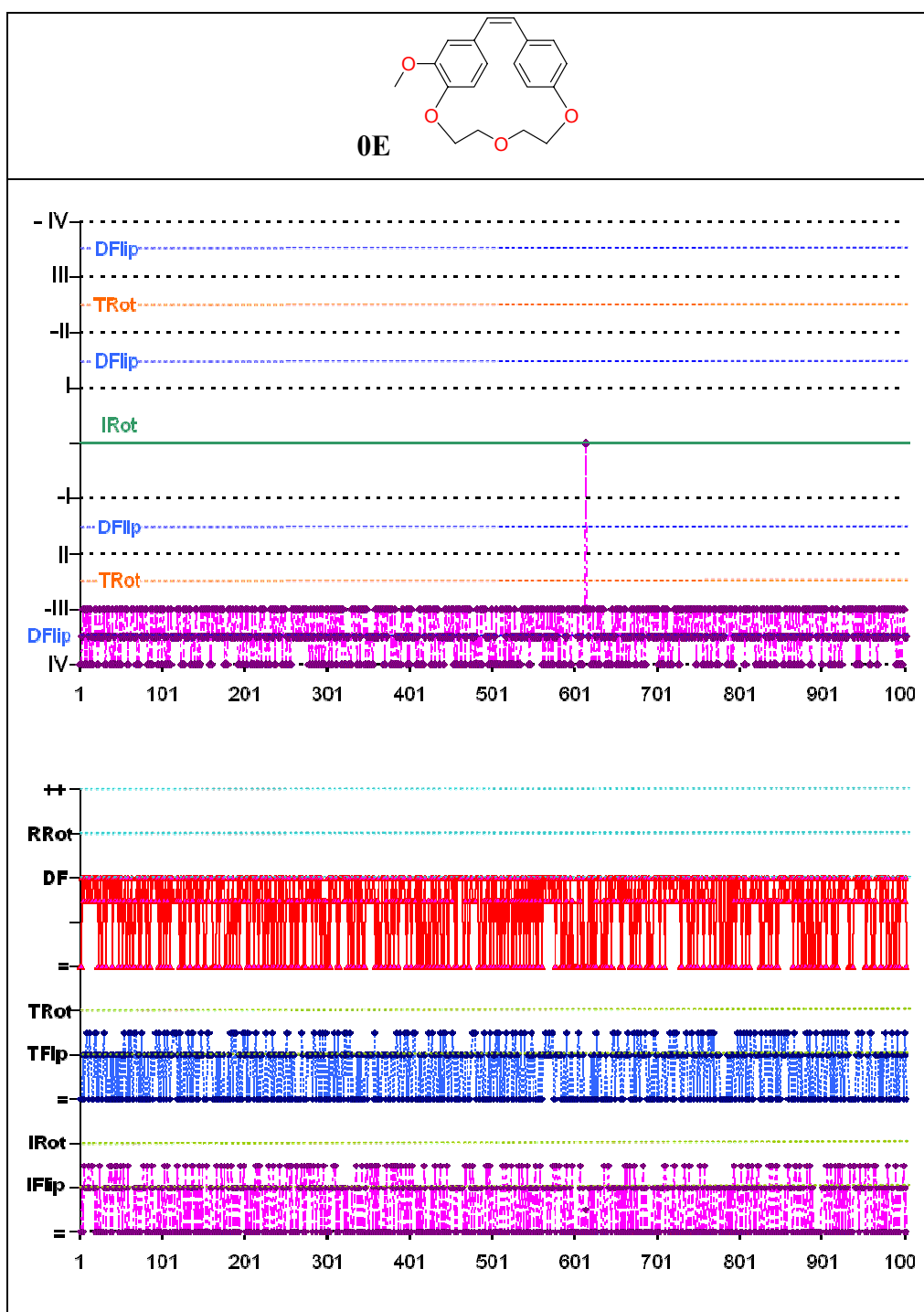


Figura 67b. Conformaciones (gráfica superior) y transiciones observadas (gráfica inferior) en la dinámica molecular a 1200K del compuesto **OE**.

Tanto en la figura 67a como en la 67b se muestra en la gráfica inferior: En rojo las de los dos anillos (sin cambios: =, rotación de alguno de los anillos: RRoT, doble *flip*: DF y transiciones complejas:++); en azul las del fenilo y en morado las del indol (sin cambios: =, rotación de 1 anillo: IRot o TRot, *flip* de anillo: IFlip o TFlip). Los puntos entre categorías indican estados de transición de la categoría superior y los puntos de las gráficas azul o morada por encima de TRot o IRot indican transiciones complejas de ese anillo.

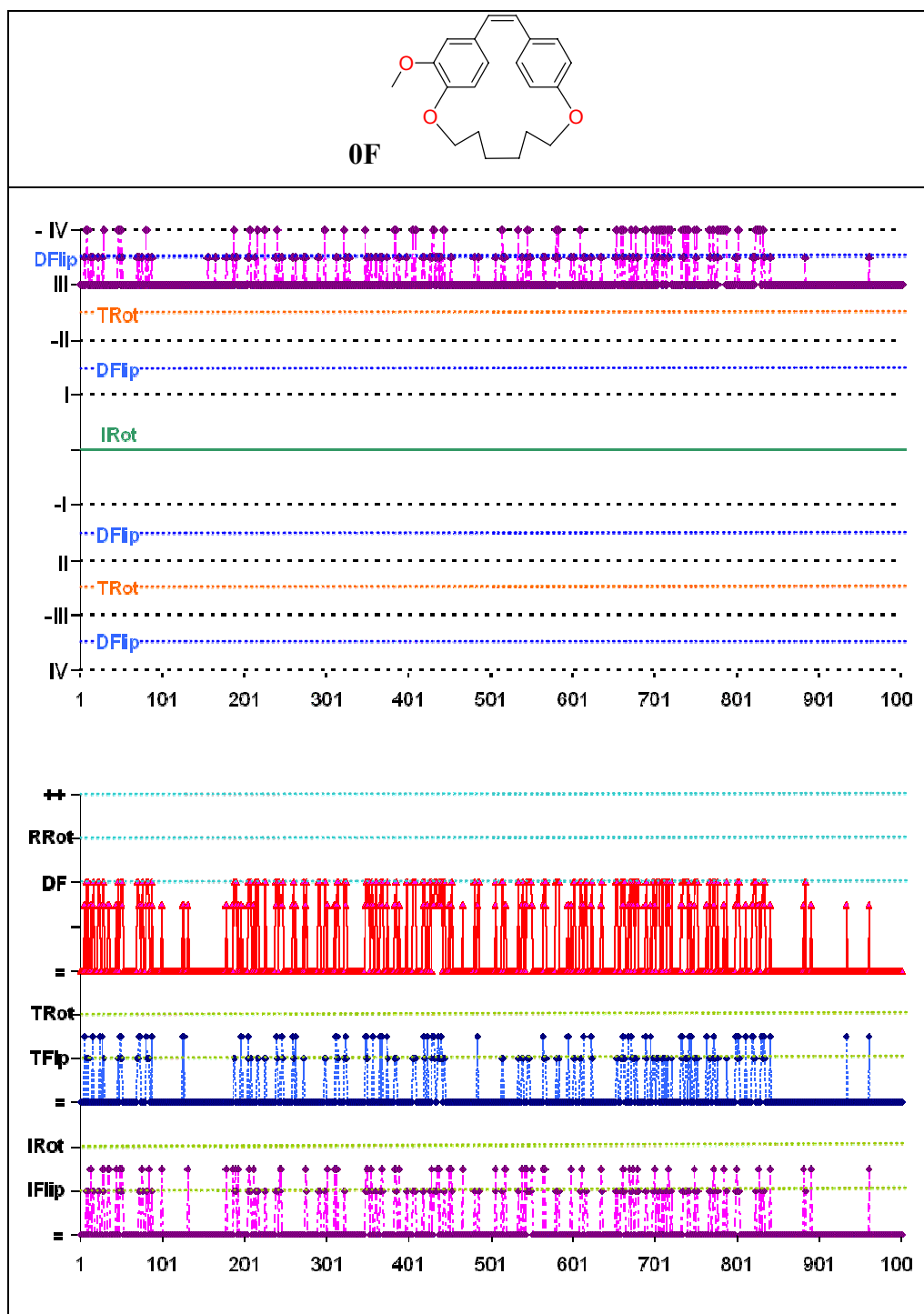


Figura 67c. Conformaciones (gráfica superior) y transiciones observadas (gráfica inferior) en la dinámica molecular a 300K del compuesto **0F**.

Tanto en la figura 67c como en la figura 67d se muestra en la gráfica inferior: En rojo las de los dos anillos (sin cambios: =, rotación de alguno de los anillos: RRot, doble *flip*: DF y transiciones complejas:++); en azul las del fenilo y en morado las del indol (sin cambios: =, rotación de 1 anillo: IRot o TRot, *flip* de anillo: IFlip o TFlip). Los puntos entre categorías indican estados de transición de la categoría superior y los puntos de las gráficas azul o morada por encima de TRot o IRot indican transiciones complejas de ese anillo.

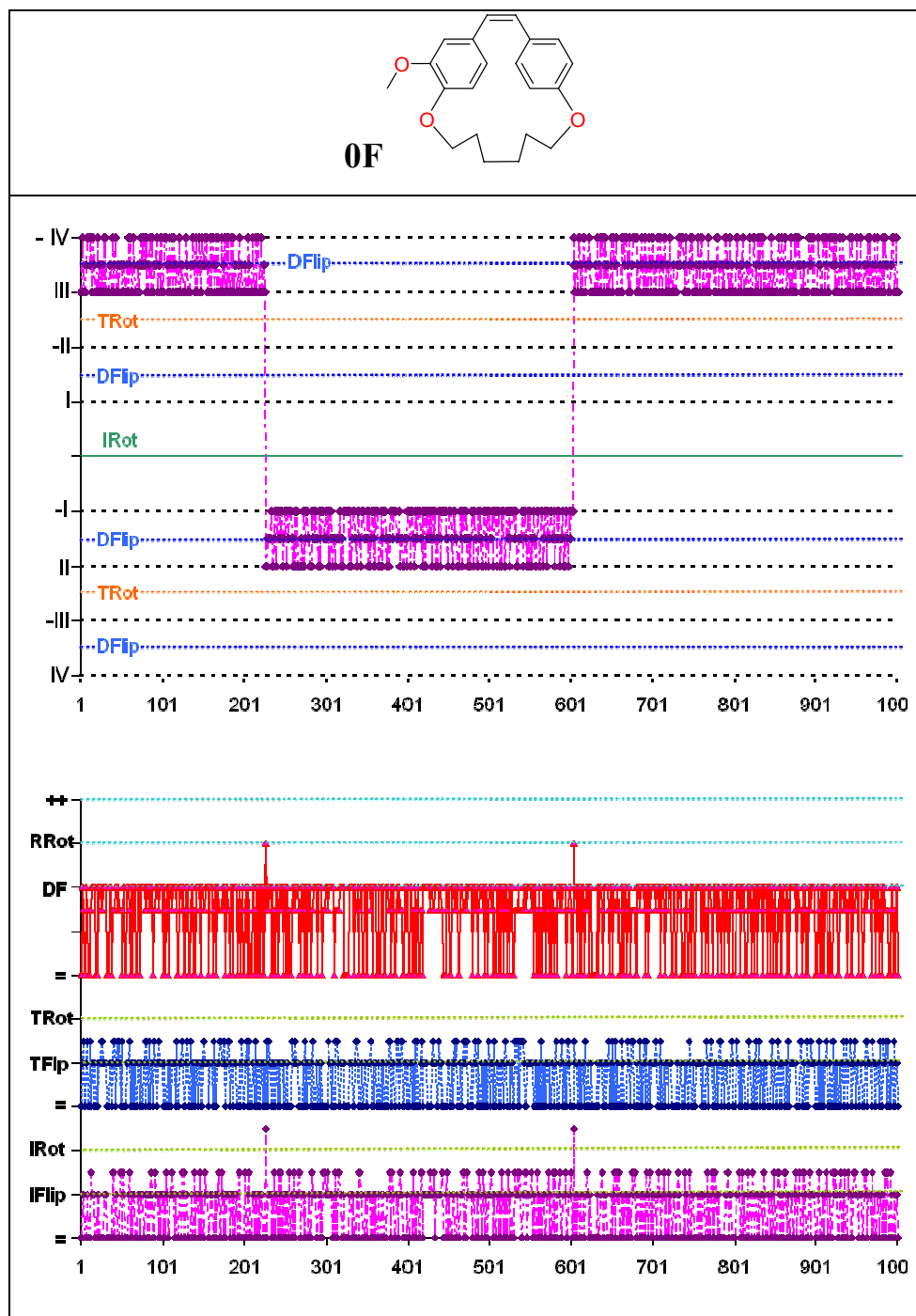


Figura 67d. Conformaciones (gráfica superior) y transiciones observadas (gráfica inferior) en la dinámica molecular a 1200K del compuesto **0F**.

Para el compuesto con espaciador más corto, el aumento de temperatura a 1200K sólo modifica la frecuencia con la que se producen estas transiciones (figura 67b). Sin embargo, para el compuesto con el espaciador más largo (**0F**, figura 67d), se observa que al aumentar la temperatura a 1200K, se alcanzan, además, las conformaciones -I y +II, debido a que se produce la **rotación del anillo trisustituido**.

Anteriormente, en el análisis conformacional de dioles *trans* relacionados con **0E** y **0F**, en los que existe un anillo disustituido y otro tetrasustituido (**0J** y **0K**) habíamos descrito una situación similar: a 1200K el **anillo disustituido** de **0K** efectuaba rotaciones, (a través del macrociclo de mayor tamaño con espaciador hexametileno) mientras que el de **0J** no lo hacía (debido al menor tamaño del macrociclo).^{44,48} Sin embargo, en el caso de **0F**, el anillo que rota es el **anillo trisustituido**, mientras que en **0K** es el anillo disustituido el que lo hace.

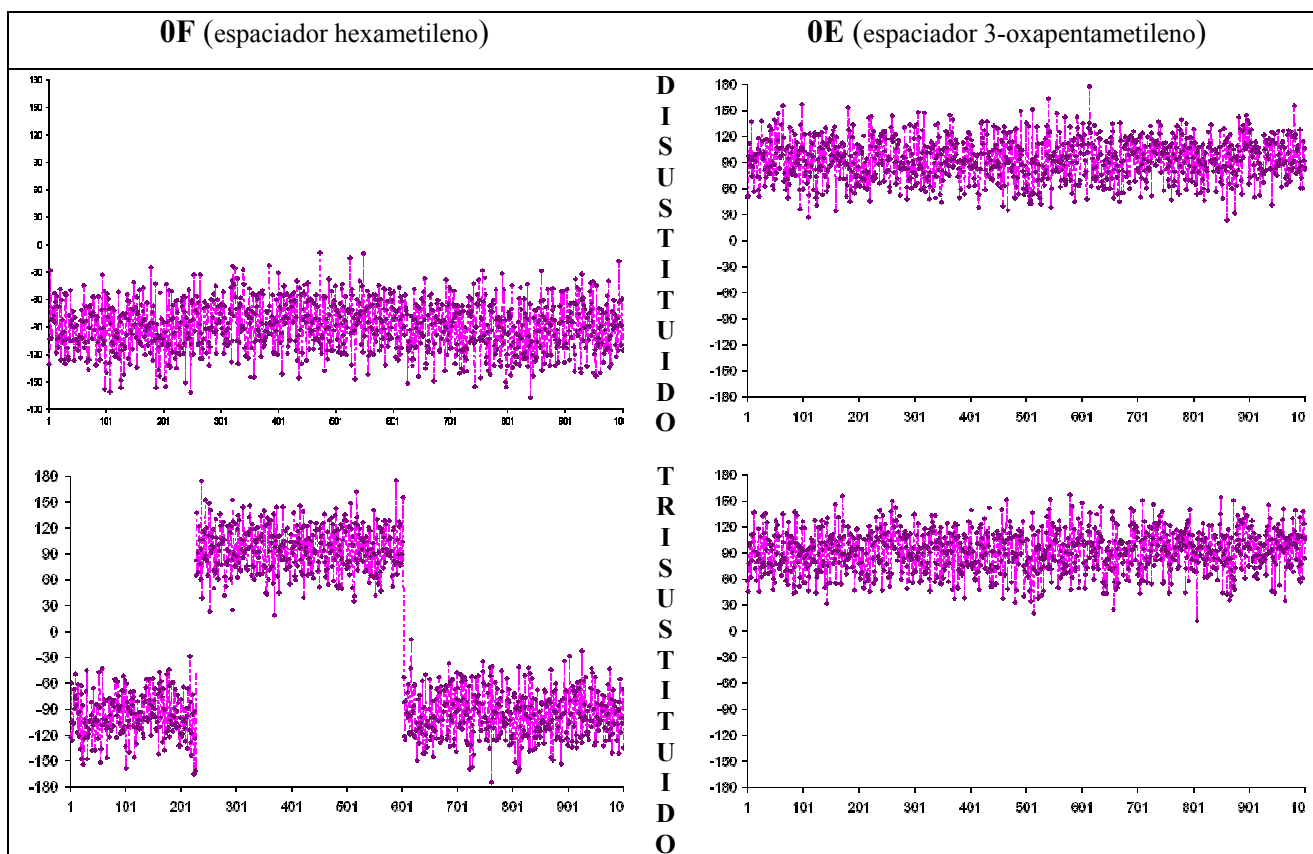
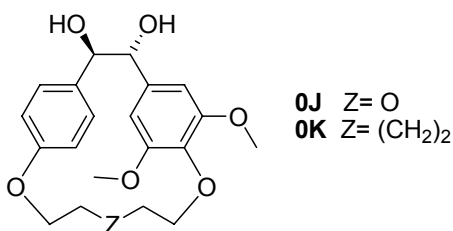


Figura 68. Representación gráfica de los valores de los ángulos diedros DI y DT (definidos anteriormente y que nos indican la disposición de los anillos aromáticos respecto al puente olefinico) de las conformaciones obtenidas en los estudios de dinámica molecular a 1200K de **0F** (a la izquierda) y **0E** (a la derecha). Las gráficas superiores se corresponden con los valores de los ángulos diedros del anillo disustituido y las inferiores con los del anillo trisustituido. Así, se observa que sólo se produce un cambio (giro del anillo) en el anillo trisustituido de **0F**.

Una posible explicación para dicha discrepancia es que el anillo tetrasustituido de **0G** no puede efectuar la rotación, ya que esto requeriría el paso de un metoxilo a través del espacio intraanular. En el caso de **0F**, tanto el anillo disustituido como el trisustituido podrían efectuar la rotación pasando un hidrógeno por el espacio intraanular. Si el anillo que rota es el anillo trisustituido su sustituyente se dirige hacia el exterior, no interfiriendo con la rotación. Por el contrario, cuando se produce la rotación del anillo disustituido, el anillo trisustituido debe situarse perpendicular al plano del doble enlace, con el fin de permitir el paso del otro anillo por el espacio intraanular. El metoxilo se dirige entonces hacia el interior, viéndose dificultada la rotación por las interacciones entre el metoxilo, el espaciador y el anillo en rotación.

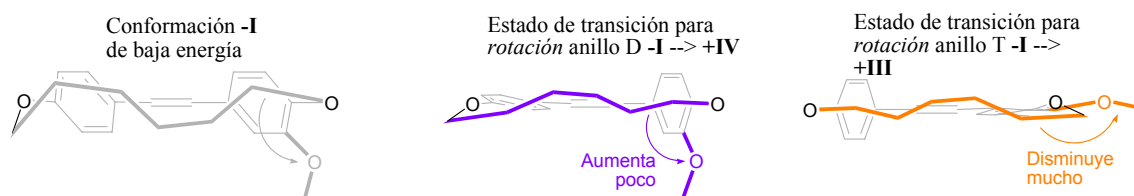


Figura 69. Esquema de la interacción entre el espaciador y el metoxilo del anillo trisustituido del compuesto **0F** cuando se produce la rotación de dicho anillo que interconvierte las conformaciones $-I$ y $+III$ (en naranja a la derecha) y cuando se produce la rotación del anillo disustituido (en morado, en el centro).

En el caso de **0E** (en que el hueco intra-anular es más pequeño) y en los de **84** y **87** no se observan los giros de los anillos en la simulación, ni siquiera a temperaturas superiores (1500K). En el caso de **84** y **87**, no se observa en las simulaciones transiciones causadas por la rotación del anillo de indol, como por ejemplo I-III ó II-IV y viceversa, aunque si se observan conformaciones en las que el anillo de indol es coplanar con el doble enlace (conformaciones cercanas al estado de transición de la rotación del anillo de indol). Al igual que se ha mencionado para **0F**, el metoxilo del anillo trisustituido dificulta el giro del otro anillo. En el caso de los derivados indólicos, puede esperarse que este efecto sea incluso más pronunciado, ya que el enlace indol N-C hace al espaciador menos flexible.

III.4.A.3 Justificación de la apariencia de los espectros de RMN de las olefinas **84** y **87**.

Todas las olefinas macrocíclicas presentan unos espectros de RMN con un único juego de señales y en los que los núcleos que se intercambian mutuamente resuenan isocronos, excepto **0E** y **87**, en los que están ensanchadas. Como se ha indicado anteriormente y teniendo en cuenta la facilidad para la rotación de los anillos encontrada en los experimentos de dinámica molecular, la situación puede explicarse considerando una interconversión rápida entre las especies I-IV, independientemente de su helicidad. Esta rápida interconversión requiere que al menos dos de los movimientos considerados (giro de cada uno de los anillos o **dobles flip**) sean rápidas en la escala de tiempo de la RMN (teniendo en cuenta la diferencia de entorno magnético que tiene que ser promediada). El **dobles flip** parece ocurrir con facilidad, por lo que sólo se requiere que el giro de uno de los dos anillos también sea rápido. El análisis de las dinámicas moleculares permite deducir la facilidad relativa de giro de los anillos, que en todos los casos es sustancialmente más lenta que el **dobles flip**.

El compuesto **87**, con un anillo tetrasustituido, muestra en sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C un único juego de señales, donde las correspondientes a los átomos mutuamente intercambiables del anillo tetrasustituido (20-OMe/23-OMe y H-21/H-22) están ensanchadas de manera significativa. La **rotación más lenta del anillo indólico**, que requiere el paso de los hidrógenos H-5/H-6 a través del espacio intra-anular (intercambio de las conformaciones enantioméricas -I/+III y +I/-III), puede explicar este ensanchamiento (el entorno de 20-OMe/23-OMe y H-21/H-22, químicamente equivalentes, es diferente en dichas conformaciones intercambiables). Otra posibilidad para explicar este ensanchamiento, consiste en una **rotación intermedia del anillo-Q** en la que un grupo metoxilo pasa a través del espacio intra-macroscíclico, aunque es menos probable. En ambas posibilidades, debe producirse un **rápido dobles-flip**. En caso contrario, observaríamos dos juegos completos de señales, o un solo juego que se correspondería con la disposición más estable (por ejemplo, N-espaciador *endo* -I/+III predominaría sobre N-espaciador *exo* +II/-IV).

Considerando los resultados de la dinámica molecular, la rotación del anillo tetrasustituido no debe ser rápida. Además, para **84**, con un anillo trisustituido, la dinámica molecular sugiere que el anillo de indol tampoco le permite rotar con facilidad. Esto parece apuntar a la rotación del anillo de indol como el origen de la diferencia. Sin embargo, el anillo de indol tampoco gira con facilidad, ni en la olefina **84** ni en la **87**. Estas consideraciones estarían de acuerdo con las características espectroscópicas descritas para **87**, considerando que el ensanchamiento de los metoxilos y los protones aromáticos es causado por el giro del indol. Sin embargo, esto conduciría a un espectro para **84** en el que el anillo trisustituido y el del indol darían lugar a dos juegos de señales (uno correspondiente a I-II y el otro a III-IV), salvo que la rotación del indol se viera acelerada por la supresión de un metoxilo (hecho que no se observa en las dinámicas moleculares). Una segunda posibilidad, acorde con los resultados de la mecánica molecular, es que una de las parejas de conformaciones (I/II ó III/IV) contribuyera menos al equilibrio.

Como ya se ha indicado, para explicar los espectros de las olefinas no indólicas, se ha propuesto una situación diferente: dos giros rápidos.⁴⁸ Esto implicaría que el cambio de un anillo fenólico por el de indol acarrea una gran diferencia en la movilidad del anillo. Por otra parte, el anillo de indol es, magnéticamente, mucho más anisotrópico que los equivalentes fenólicos considerados, por lo que la diferencia de desplazamiento químico en presencia de estos se reduciría, y con ella la velocidad del proceso que intercambia los sitios mutuamente intercambiables.

De todo ello parece desprenderse que los intercambios entre conformaciones son suficientemente rápidos cuando el espaciador es mayor (hexametileno), reduciéndose la movilidad cuando se reduce el tamaño (**0E**, espaciador 3-oxapentametileno) o aumenta la rigidez debido a la presencia del sistema indol (**84** y **87**). En estos casos el doble *flip* debe seguir siendo rápido y el giro del indol intermedio, produciéndose con mayor dificultad para **84**, en el que además debe predominar una de las conformaciones mayoritariamente.

	Doble flip	Giro D	Giro T	Giro Q	Giro I	RMN	Explicación
0D	+++	-	+	No	-	1 juego	Intercambio rápido Promedio
0E	+++	●	+ / ●	-	-	1 juego ensanchado	Intercambio intermedio
0F	+++	+	+	-	-	1 juego	Intercambio rápido Promedio
84	+++	-	+ / ●	-	+ / ●	1 juego	Intercambio lento Predominio de 1 conformación
87	+++	-	-	No	+ / ●	1 juego ensanchado	Intercambio intermedio

Tabla 17. Resumen del análisis conformacional de las olefinas, donde +++ indica un giro rápido, + giro menos rápido, ● indica giro lento y No que el giro está impedido. Las letras D, T, Q e I se refieren a los anillos aromáticos disustituídos, trisustituídos, tetrasustituídos y *N*-metilindol, respectivamente.

III.4.B Dioles y diacetatos.

III.4.B.1 Análisis de conformaciones.

III.4.B.1.a. Análisis de conformaciones de dioles con dos restos fenilo.

El análisis conformacional de los dioles se complica por la existencia de una mayor libertad conformacional producida por la posibilidad de giro del puente, que no tenía lugar en el caso del puente olefínico.^{44,48,60} Para este análisis conformacional se pueden tomar en consideración las posibilidades representadas en la figura 70: **a) rotación de un anillo (A)**, **b) rotación del otro anillo (B)**, **c) rotación del puente**, que conlleva el cambio entre las dos disposiciones *sinclinales* para los dos restos fenilo, y **d) cambio de la helicidad** de los anillos (signos de los ángulos diedros definidos por los planos de los anillos con el enlace central del puente). El giro de los anillos sin completar su rotación puede dar lugar a múltiples conformaciones en intercambio rápido, ya que no existe una restricción severa de la misma por no requerir del paso de los sustituyentes a través del espacio intraanular. El cambio entre una conformación *sinclinal* y la otra, producida por giro del puente, tampoco presenta este tipo de limitación.

⁶⁰ a) Pennigton, W.; Chakraborty, S.; Paul, I. C.; Curtin, D. Y. Crystal Structures of D-(+)- and *meso*-Hydrobenzoin. Absolute Direction of the Dipole Moment of D- and L-Hydrobenzoin in the Crystal and Correlation with Crystal Morphology, Pyroelectric Effect, and Absolute Configuration. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *110*, 6498-6504. b) Momchilova, T. G.; Ivanov, P. M. MM2 Conformational-Analysis of Diastereoisomers with Phenyl Groups on Neighboring Carbon-Atoms and Intramolecular Hydrogen-Bonding. *Theochem. Mol. Struct.* **1993**, *288*, 133-149.

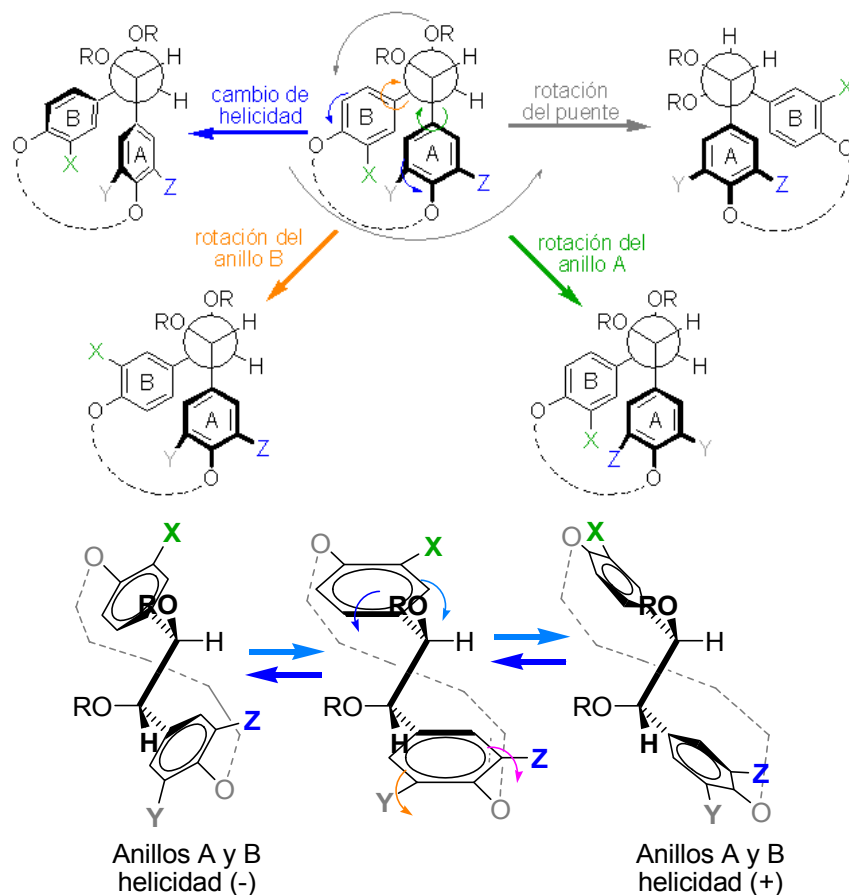


Figura 70. Posibilidades de cambio conformacional para los dioles: giro del anillo A (flechas verdes), giro del anillo B (flechas naranjas), giro del puente (que cambia de una disposición (+)-*sinclinal* a otra (-)-*sinclinal* de los grupos fenilo, flechas grises) y cambio de helicidad de los anillos (flechas azules). Esta última posibilidad, se detalla en la representación de la parte inferior de la figura.

Las cuatro posibilidades de cambio conformacional descritas en la figura 70 pueden producir dieciséis conformaciones de referencia, que se representan en las figuras 71 y 72. En la primera de ellas se presentan las conformaciones indicando la disposición de distintos elementos que las caracterizan: el puente (*Sinclinal* + ó -; OH,OH- *gauche* o *anti*), la helicidad de los anillos y la situación de la rotación de cada uno de los anillos, representada por la situación de uno de los sustituyentes.

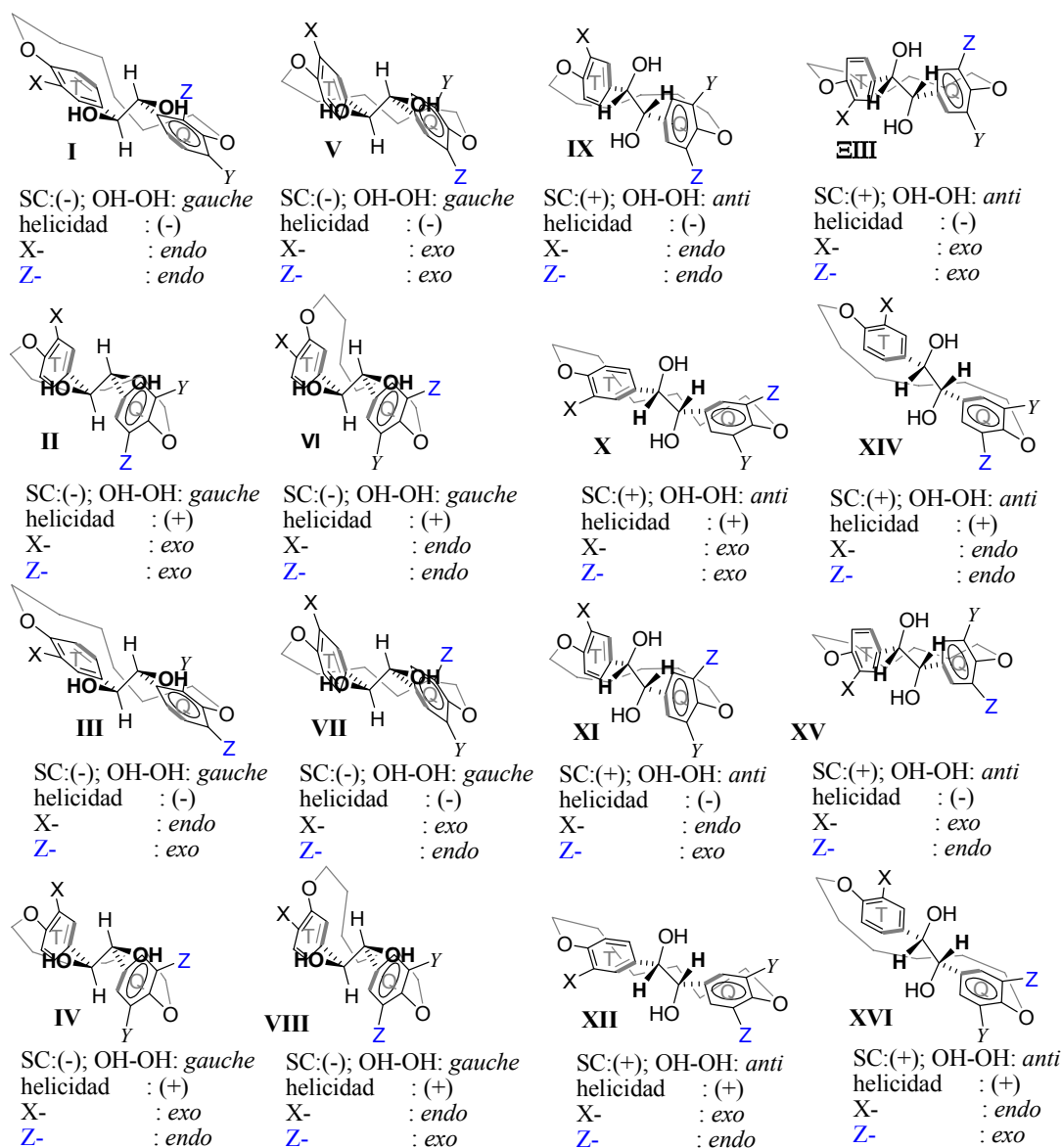


Figura 71. Conformaciones de referencia I-XVI para los dioles macrocíclicos, producidas por giro del puente, los restos fenilo A y B y el cambio de helicidad. En la figura se han representado de forma general para un diol de configuración *trans*, que puede adoptar ocho conformaciones con disposición *gauche* de los grupos hidroxilo del puente (I-VIII) y otras ocho conformaciones con disposición *anti* de dichos grupos hidroxilo (IX-XVI). Los dioles de configuración *cis* (no representados) pueden adoptar conformaciones análogas, todas ellas con disposición *gauche* de los grupos hidroxilo, ocho con signo + y otras ocho con signo - para el ángulo diedro entre ambos. Sólo se ha representado el enantiómero *S,S*.

En la siguiente figura, se representan las conformaciones relacionándolas mediante el cambio conformacional que ha tenido lugar para pasar de unas a otras. El giro del puente se puede producir sin cambio de helicidad (flechas sólidas) o con cambio simultáneo de la helicidad (flechas de puntos).

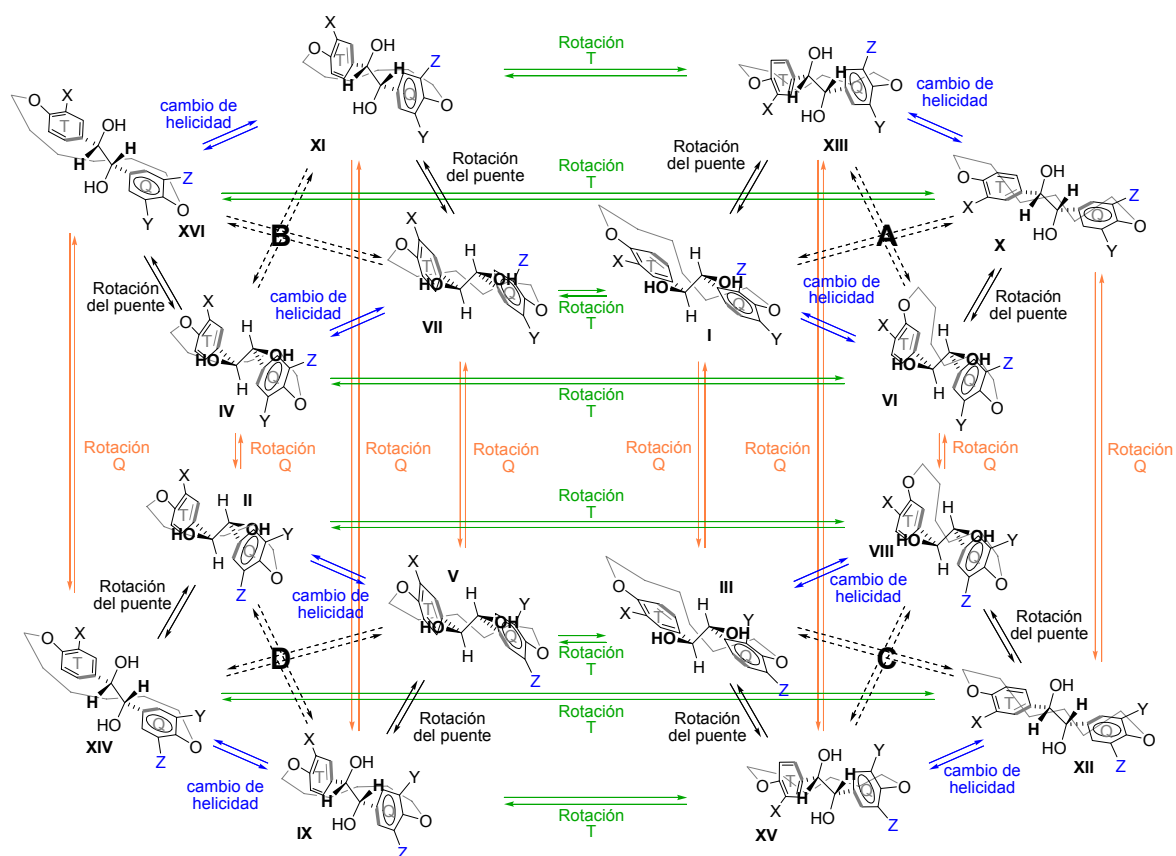


Figura 72. Equilibrio conformacional general de dioles macrocíclicos (se ha representado para un diol de configuración *trans*). Se representa la **rotación del anillo-T** en sentido horizontal, la **rotación del anillo-Q** en sentido vertical y el **cambio de helicidad** y la **rotación del puente** en las conexiones de las conformaciones de cada grupo (**A, B, C y D**) formado por cuatro conformaciones. Las flechas discontinuas indican cambios simultáneos en la helicidad y en el puente.

De acuerdo con lo observado en trabajos anteriores, las conformaciones preferidas para los dioles con configuración *trans* son aquellas en que los dos grupos hidroxilo están en disposición *gauche* (I-VIII en la figuras 71 y 72), mientras que en el caso de los dioles *cis* las dieciséis conformaciones tienen los grupos hidroxilo en disposición *gauche*.^{44,48,60} En la figura 73, se esquematizan de forma simplificada los equilibrios por rotación del puente, ya que no se consideran otros cambios conformacionales y sólo se representa un enantiómero para cada uno de los dioles. Como se ha comentado más arriba, este cambio conformacional puede ser rápido, ya que no supone el paso de ningún sustituyente a través del macrociclo.

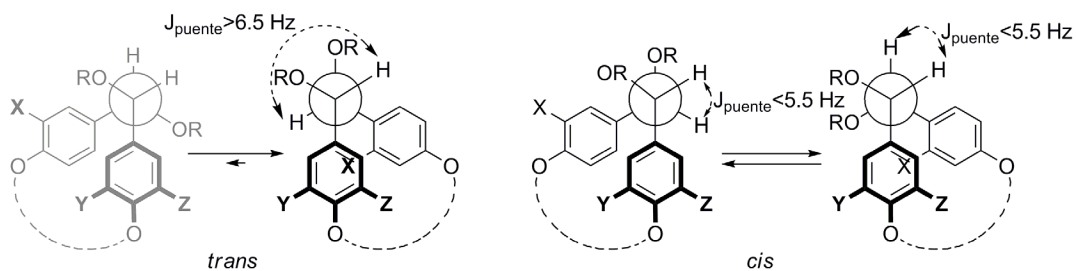


Figura 73. Representación simplificada de las posibilidades conformacionales, para los dioles *trans* y *cis*, generadas por rotación del enlace central del puente. Sólo se ha representado un enantiómero (una configuración del puente) en esta figura y en las figuras siguientes.

Debido a su mayor complejidad y a que ya se ha realizado previamente una aproximación al análisis conformacional de los dioles con dos restos fenilo, únicamente se comentarán más adelante las situaciones particulares de los derivados indólicos (tanto los de configuración *trans*, **86** y **89**, sus diacetatos, **91** y **93**, como los de configuración *cis*, **85** y **88**, como los diacetatos, **90** y **92**) obtenidos en este trabajo.

Como resumen de lo observado en los dioles macrocíclicos con dos restos fenilo, cabe destacar que, dependiendo de los sustituyentes en los anillos y de que se trate de los alcoholes o de sus acetatos, en RMN se puede observar uno o dos juegos completos de señales. En cada uno de ellos aparecen diferenciados los protones y los carbonos químicamente equivalentes.

La existencia de dos juegos de señales indica, claramente, que hay conformaciones de estabilidades no muy diferentes y que se interconvierten lentamente en la escala de tiempo de RMN. Sin embargo, cuando sólo aparece un juego de señales puede deberse a la presencia de una sola conformación o a varias conformaciones en intercambio rápido. El ensanchamiento de las señales en algún caso indica un intercambio lento-intermedio en dicha escala de tiempo.

III.4.B.1.b. Análisis de conformaciones de dioles con un resto indolilo.

De forma similar a lo planteado para los compuestos generales, según se ha representado en las figuras 71 y 72, puede hacerse una consideración previa de las conformaciones de los dioles indólicos *trans* y *cis*. Los resultados de los cálculos de las conformaciones más estables y de las dinámicas moleculares que se comentan en el apartado siguiente se analizarán en base a estos grupos y cambios conformacionales.

Las dieciséis conformaciones representativas de los dioles *trans* se recogen en las figuras 74a y 74b y sus posibles interconversiones en las figuras 75a y 75b, mientras que las correspondientes a los dioles *cis* se han recogido en las figuras 76 y 77.

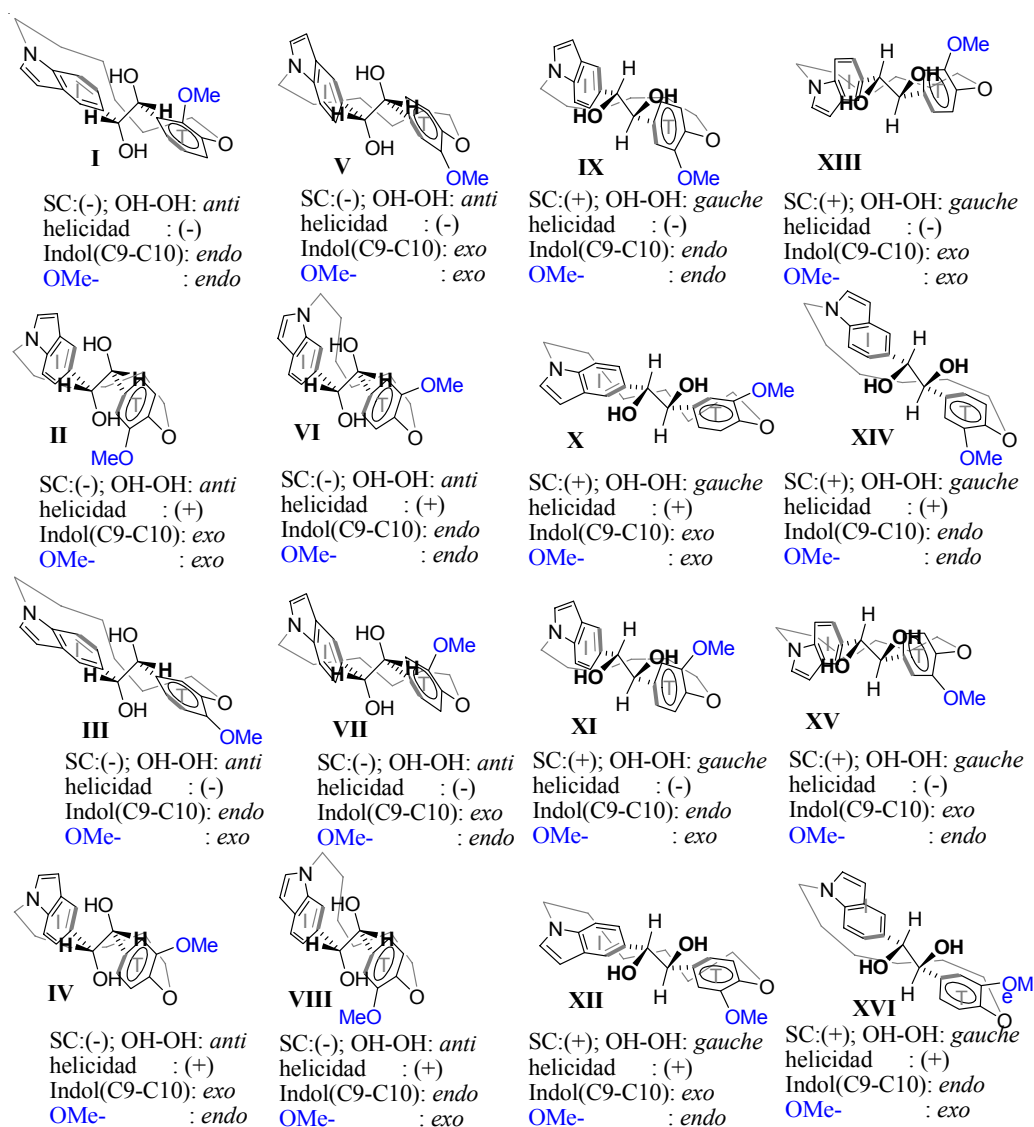


Figura 74a. Conformaciones representativas del diol *trans* **86** (diacetato **91**) coincidentes con las representadas en la figura 75a y las gráficas de las figuras 82c y 85b (izquierda).

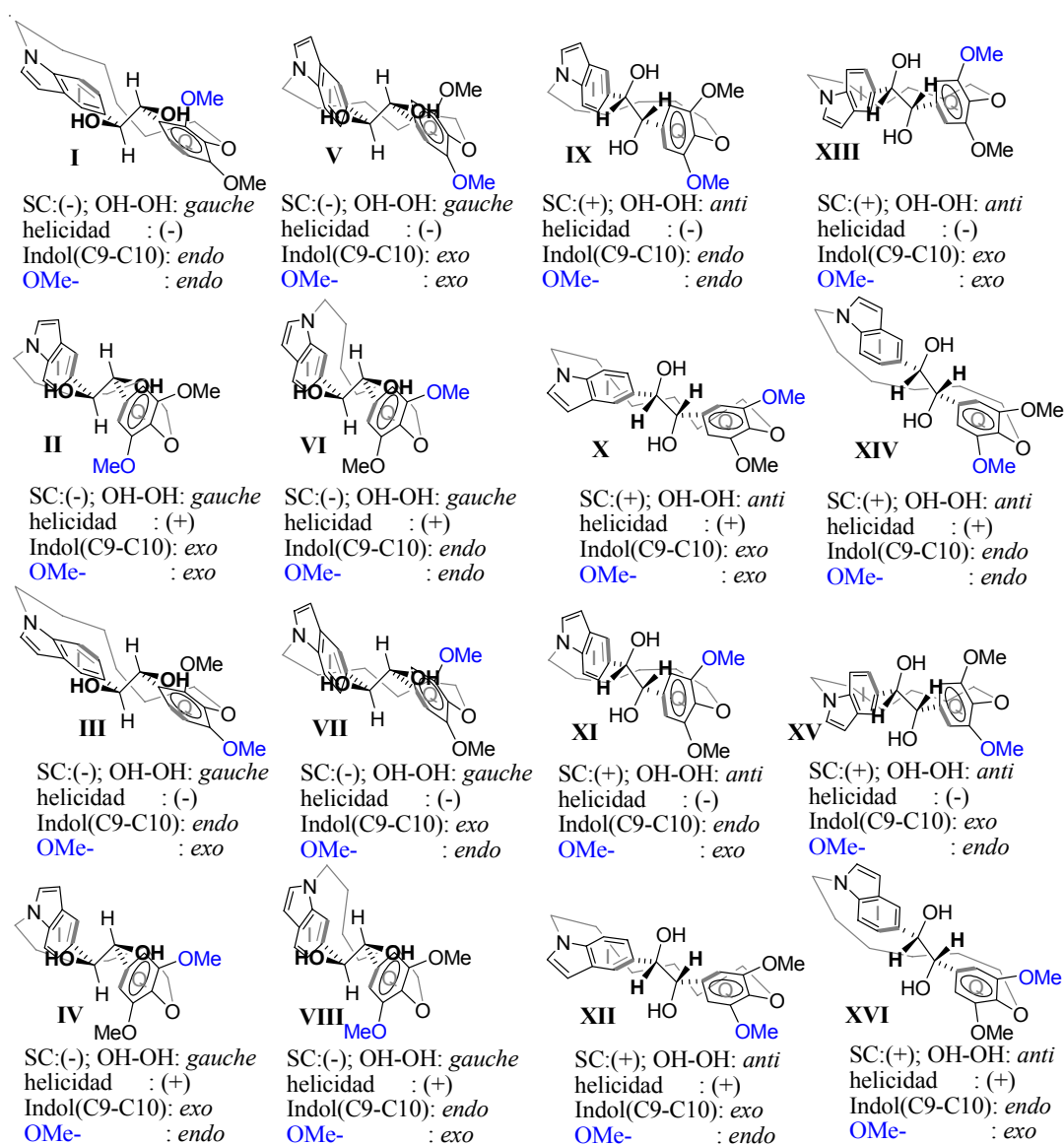


Figura 74b. Conformaciones representativas del diol *trans* **89** (diacetato **93**), coincidentes con las representadas en la figura 75b y las gráficas de las figuras 82d y 85b (derecha).

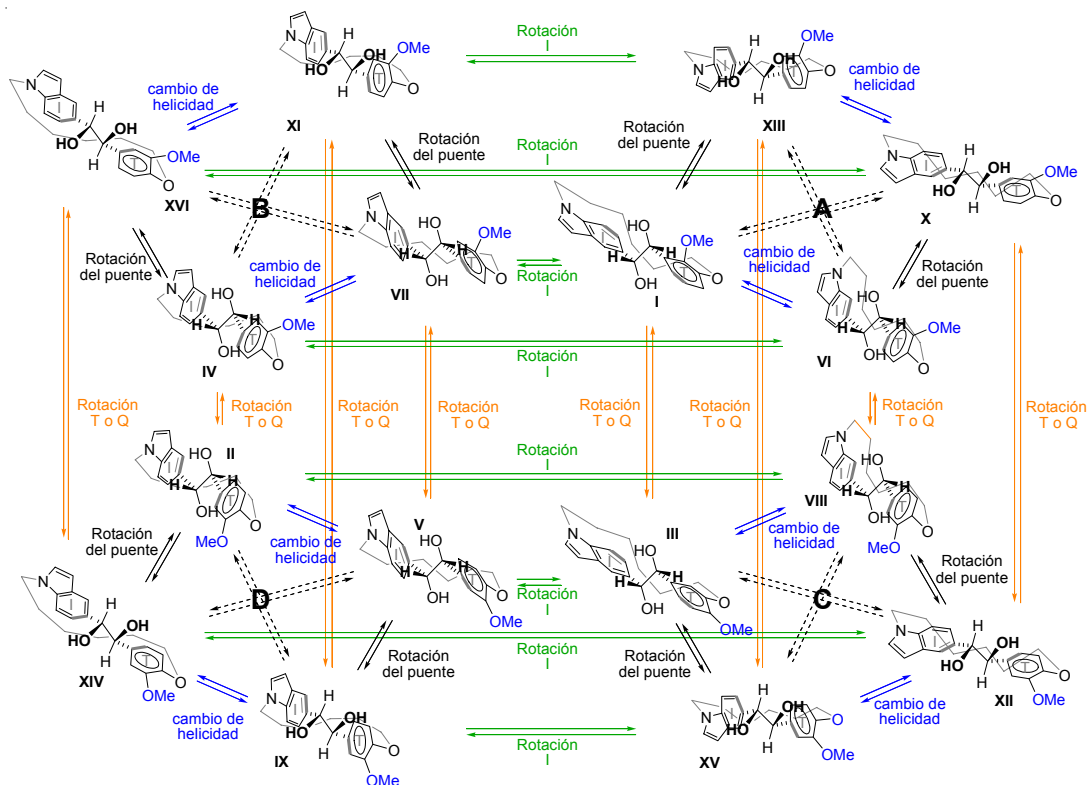


Figura 75a. Equilibrios conformacionales del diol *trans* 86.

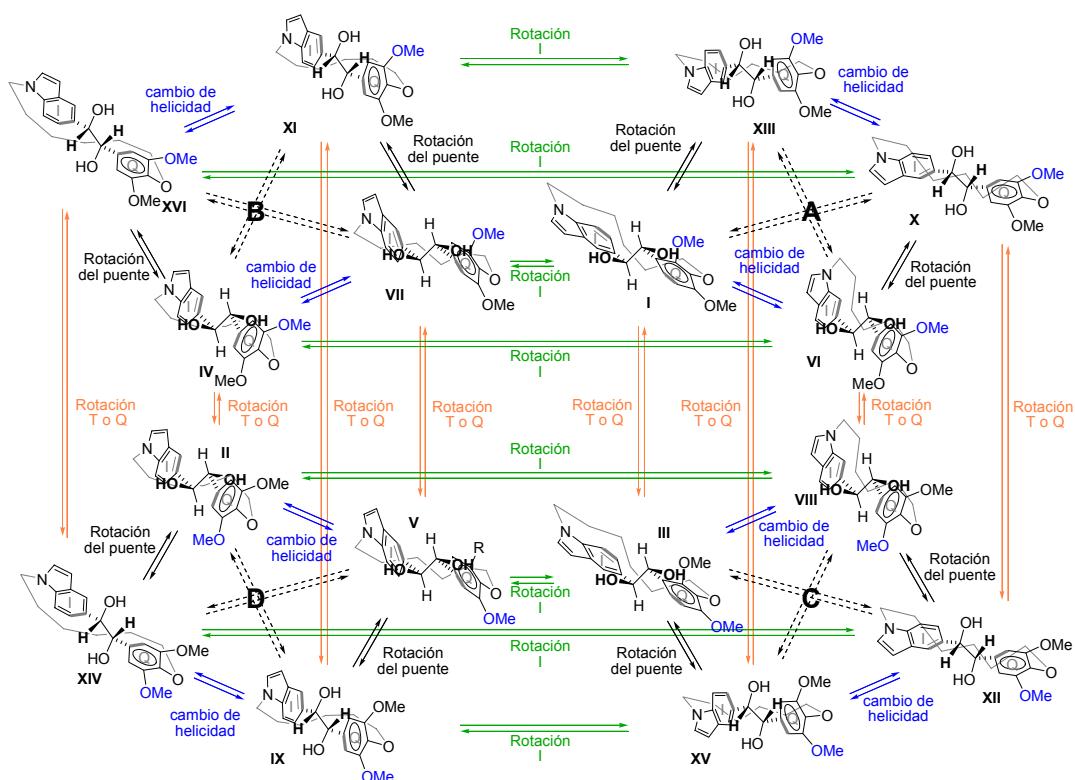


Figura 75b. Equilibrios conformacionales del diol *trans* 89. Tanto en las figuras 75a y 77 como en ésta, se representa la **rotación del anillo-T** en sentido horizontal, la **rotación del anillo-Q** (o **anillo T**) en sentido vertical y el **cambio de helicidad** y la **rotación del puente** en las conexiones de las conformaciones de cada grupo formado por cuatro conformaciones (A, B, C y D). Las flechas discontinuas indican cambios simultáneos en la helicidad y en el puente.

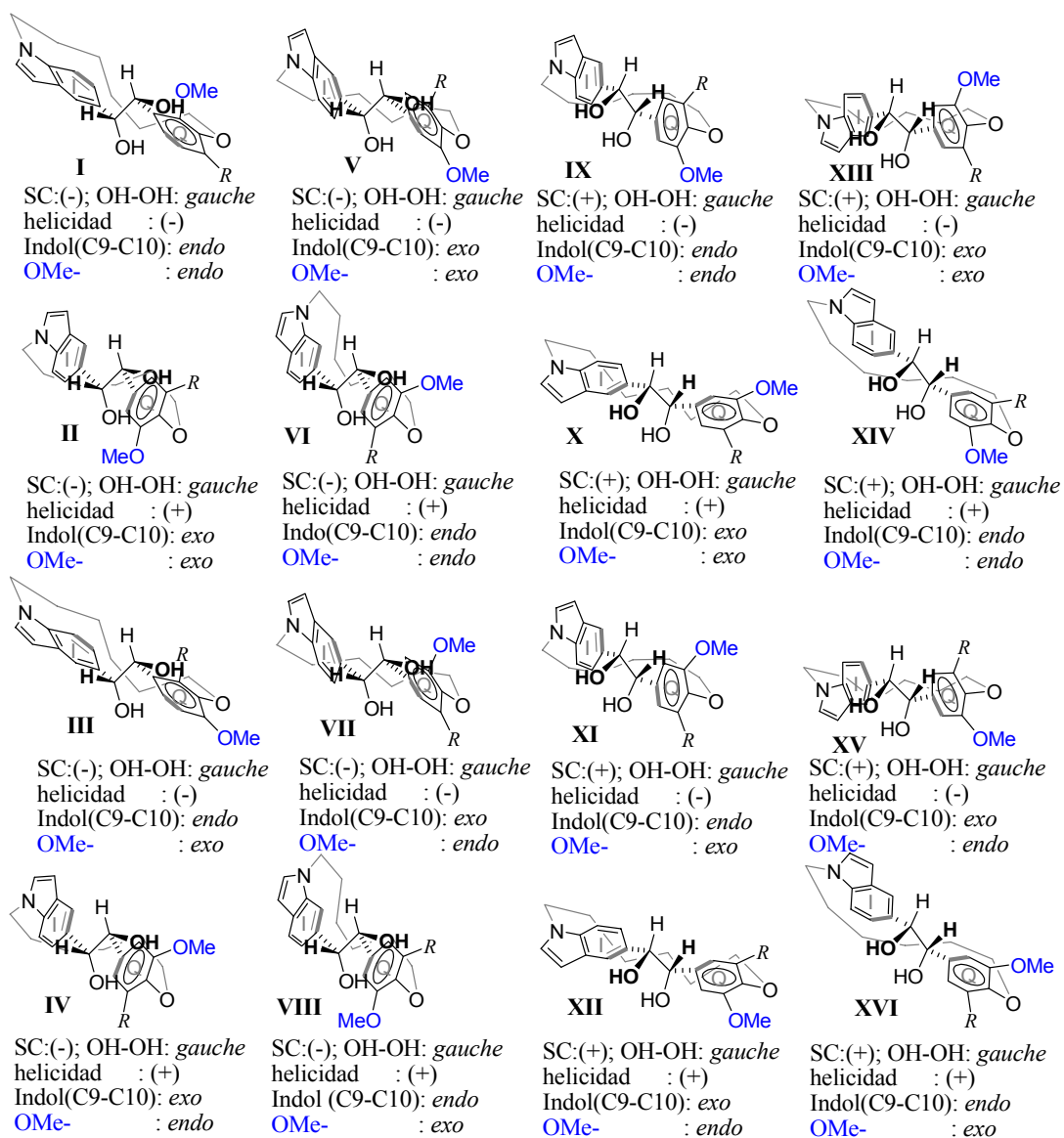


Figura 76. Conformaciones representativas de los dioles *cis* **85** (R= H) y **88** (R= OMe) (diacetatos **90** y **92**).

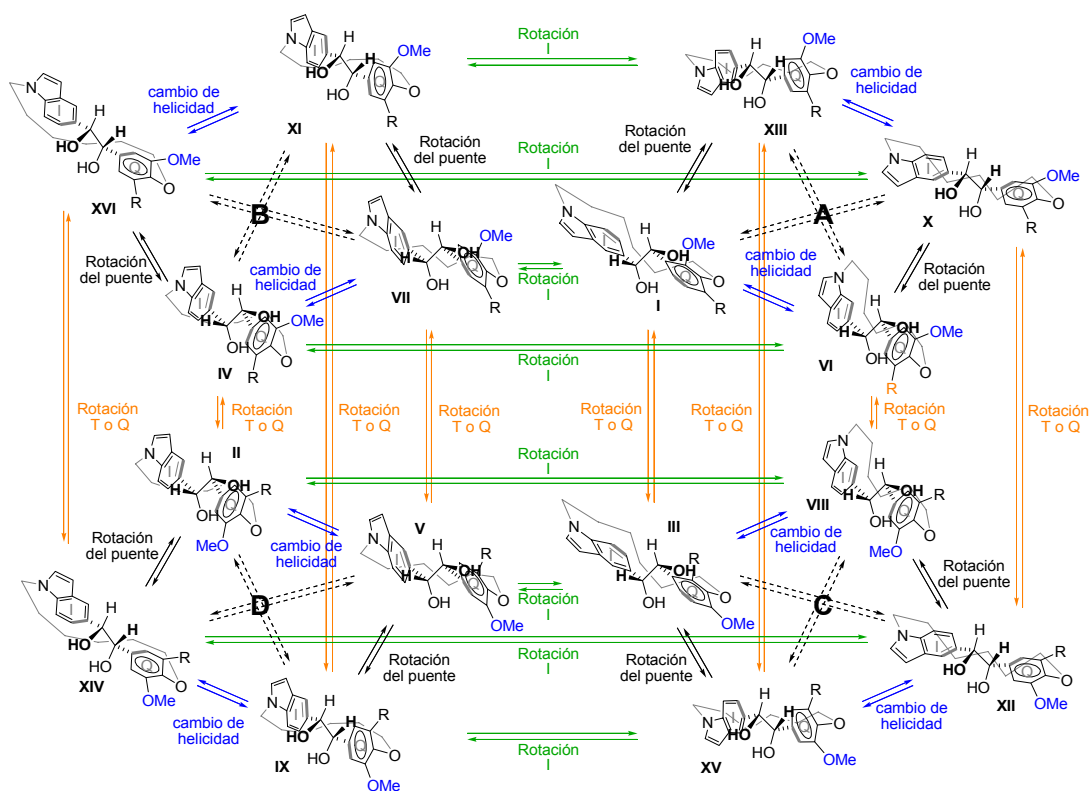


Figura 77. Equilibrios conformacionales de los dioles *cis* 85 y 88. Para los dioles 88 *cis* y 89 *trans*, con anillo Q simétrico, las conformaciones de los grupos en la parte superior son idénticas a las de la parte inferior (A=C y B=D).

III.4.B.2 Estudios de mecánica molecular y dinámica molecular de dioles y acetatos.

Al igual que en las olefinas macrocíclicas, es posible que no todos los grupos conformacionales (representados genéricamente por I-XVI) sean accesibles, por lo que no habría que tenerlos en cuenta en la discusión conformacional. Para intentar estudiar las conformaciones de menor energía de los dioles *cis* **85** y **88** y *trans* **86** y **89** se llevaron a cabo búsquedas conformacionales (Monte Carlo)⁵⁵ utilizando mecánica molecular (campo de fuerzas MM3 con cloroformo como disolvente),⁵⁶ que se complementaron con estudios de dinámica molecular a distintas temperaturas (típicamente 300K y 1200K).⁵⁸

Como se ha indicado con anterioridad, las conformaciones (o más propiamente los grupos conformacionales) propuestos para los dioles se generan por la rotación de los tres enlaces sencillos que conectan los dos anillos aromáticos. Así, para facilitar el análisis de las conformaciones encontradas, se midieron varios ángulos diedros (indicados por círculos de color naranja en la figura 78) que permitían determinar el estado de cada uno de los enlaces rotables y asignar las conformaciones a los grupos I-XVI anteriormente definidos.

El enlace central del puente (en gris en la figura 78) genera las disposiciones + y – sinclinales, y puede medirse utilizando el diedro formado por los dos átomos de carbono del puente y los átomos de los anillos aromáticos unidos a ellos. Esta selección de átomos conduce a resultados independientes de la estereoquímica relativa y/o absoluta de los dioles, por lo que se ha preferido a otras posibilidades, como por ejemplo los carbonos del puente y los oxígenos de los dioles.

Para cada uno de los enlaces entre los anillos aromáticos y los carbonos del puente (indicados en verde y azul en la figura 78) se han elegido los dos carbonos del puente, el carbono del anillo aromático que es cabeza de puente del macrociclo y el carbono directamente unido a éste que conduzca por la ruta más corta a un carbono aromático sustituido. Al igual que para el enlace central del puente, esta elección es independiente de la estereoquímica relativa y absoluta del diol analizado, a diferencia de diedros que incorporan el oxígeno del hidroxilo o el hidrógeno geminal a éstos.

Como ocurría con las olefinas (para evitar que desviaciones de la posición de los átomos de los anillos aromáticos del plano del anillo condujeran a resultados dispares cuando se seleccionaba el carbono adyacente al puente de un lado o de otro del anillo aromático) se han medido ambos diedros y se ha promediado el valor del diedro indicado por los cuatro círculos naranjas de mayor tamaño (y descrito en el texto) con el complementario del diedro indicado por tres círculos naranjas de mayor tamaño y el cuarto reemplazado por el círculo naranja pequeño. Los valores de estos diedros permiten definir para cada anillo una sentido helicoidal positivo o negativo y determinar la disposición *endo* o *exo* de los sustituyentes (OMe, R, -CH=CH-) de los anillos aromáticos. El cambio de la disposición de los sustituyentes se asocia a una rotación del anillo (paso del plano del anillo por el plano definido por los carbonos del puente, el carbono del anillo unido al puente y el carbono en *para* respecto a éste último).

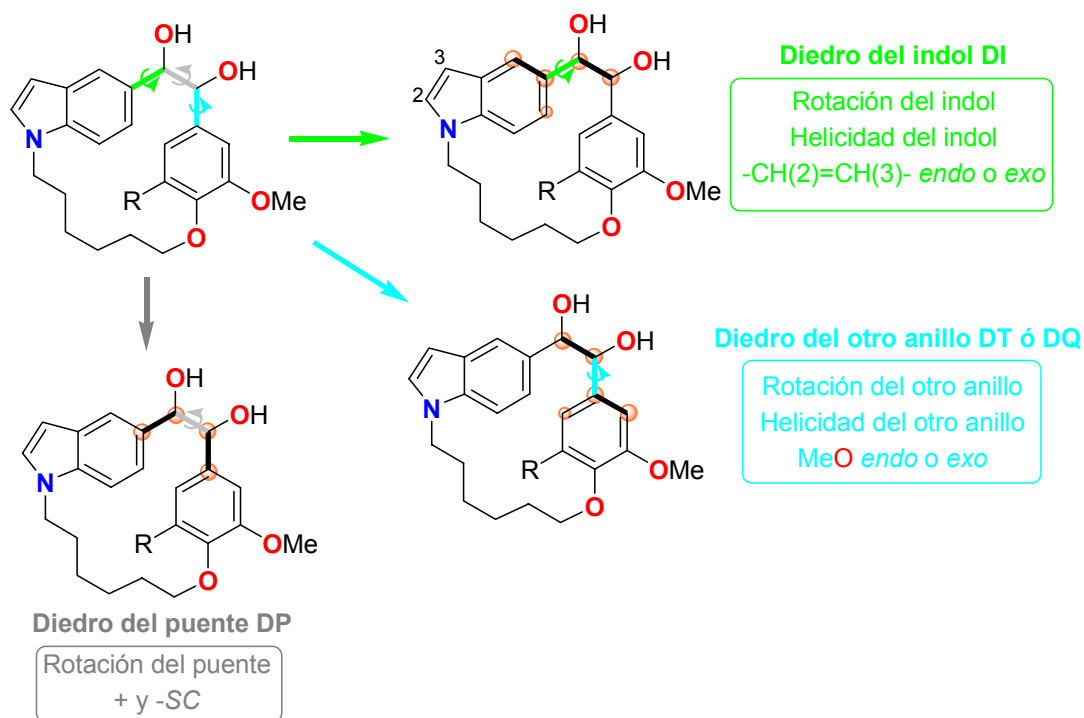


Figura 78. Ángulos diedros empleados en la asignación de las conformaciones de menor energía calculadas I-XVI y posibilidades conformacionales relacionadas con el mismo.

Una vez medidos los diedros indicados, se asignó una disposición + o – sinclinal (+ ó –SC) a las conformaciones en función del signo del **diedro del puente (DP)**. Está clasificación distingue las conformaciones tipo I-VIII (–SC), de las conformaciones tipo IX-XVI (+SC). De acuerdo con este criterio de signos, las conformaciones I-VIII se han representado en las gráficas, que se mostrarán más adelante, en la parte negativa del eje de ordenadas y las IX-XVI en la positiva. Los valores de los diedros del indol y del otro anillo permiten definir las disposiciones *endo* y *exo* y el sentido helicoidal de cada anillo, cuyas combinaciones delimitan los grupos conformacionales (tabla 18).

		IND <i>endo</i>	IND <i>exo</i>
T o Q <i>endo</i>	(-SC)	I (-) y VI (+)	IV (+) y VII (-)
	(+SC)	IX (-) y XIV (+)	XII (+) y XV (-)
T o Q <i>exo</i>	(-SC)	III (-) y VIII (+)	II (+) y V (-)
	(+SC)	XI (-) y XVI (+)	X (+) y XIII (-)

Tabla 18. Clasificación de las conformaciones en función de la disposición sinclinal, *endo/exo* de los sustituyentes y de la helicidad (entre paréntesis) que presentan.

Las disposiciones *endo* y *exo* para los sustituyentes en meta del puente de los anillos bencénicos (tanto del indol como del otro anillo) se han designado como *endo* si el sustituyente se sitúa entre los dos anillos cuando se observa el compuesto con el enlace central del puente dirigido perpendicular al plano del papel (ver figura 79). Esta definición implica que el cambio de una disposición $-SC$ a $+SC$, sin que simultáneamente se produzcan otras, conduce a un cambio de las disposiciones *endo* a *exo* y viceversa.

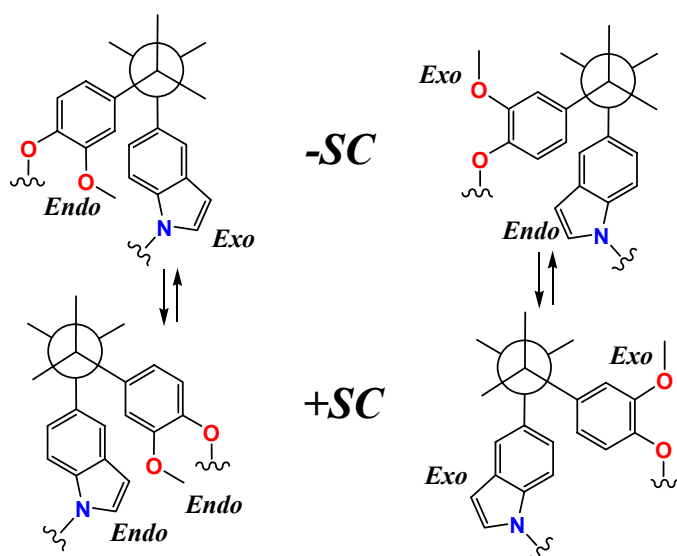


Figura 79. Representación de la asignación de la disposición de los sustituyentes del fenilo (OMe) y del indol (C9=C10). Las conformaciones inferiores se producen por la rotación del puente de las superiores (paso de $-SC$ a $+SC$ sin ningún otro cambio simultáneo y viceversa).

El sentido helicoidal adoptado por los anillos se asignó en función del ángulo que forma el plano del anillo aromático con el plano definido por los carbonos del puente y el carbono del anillo unido a ellos. Así, a los anillos con valores de los diedros DI o DT/DQ mayores de 90° o entre 0° y -90° se les asignó un sentido helicoidal negativo (-). Si dicho sentido helicoidal coincidía para ambos anillos, se asignaba a la conformación completa. Si, por el contrario, era discordante, se marcaba la conformación como no correspondiente a los grupos considerados inicialmente. En las gráficas (figura 84 y siguientes), la disposición discordante se indica por los puntos de color marrón en la parte inferior que se sitúan a la altura de $Hel \neq$.

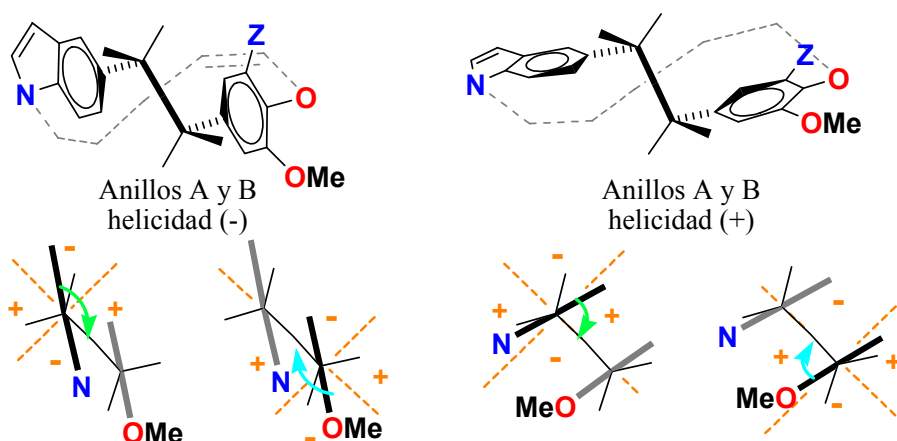


Figura 80. Representación de dos conformaciones en las que los dos anillos presentan la misma helicidad, negativa a la izquierda y positiva a la derecha. Los esquemas de la parte inferior muestran con flechas los ángulos diedros medidos (**DI** y **DT**); las líneas gruesas simbolizan el plano de los anillos aromáticos y en naranja se indican los cuadrantes que determinan cada helicidad.

El sentido helicoidal diferencia las parejas de conformaciones indicadas en la tabla 18, con lo que todas las conformaciones que poseen dos anillos con el mismo sentido pueden asignarse a los dieciséis grupos I-XVI.

Además, con el fin de analizar con más detalle la disposición de los anillos aromáticos, se ha analizado la posición de los mismos con respecto a los sustituyentes del carbono bencílico. Así, los sustituyentes dividen la circunferencia en tres tercios, que se han denominado C-H, C-OH y H-OH en función de los sustituyentes que los delimitan. En el diagrama (figura 81) se indica la situación del enlace C-C del anillo aromático que está más cercano al primer sustituyente (C9-C10 del indol, indicado por un círculo negro), de acuerdo con los criterios indicados en la figura.

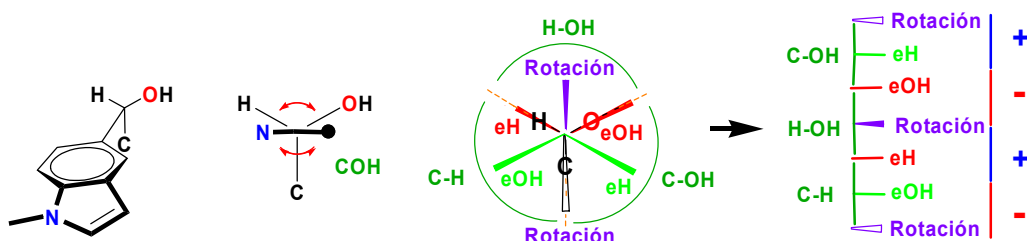


Figura 81. Representación de la disposición del indol respecto a los sustituyentes del carbono del puente al que se encuentra unido. En verde oscuro se indican los tercios delimitados por los sustituyentes; en morado, la alineación del anillo con el enlace; en rojo, la alineación de un sustituyente con el lado C9=C10 del anillo y en verde claro, la alineación de un sustituyente con el lado opuesto del anillo. A la derecha se muestra la helicidad (+ ó -) que presenta el anillo cuando se encuentran en las disposiciones establecidas.

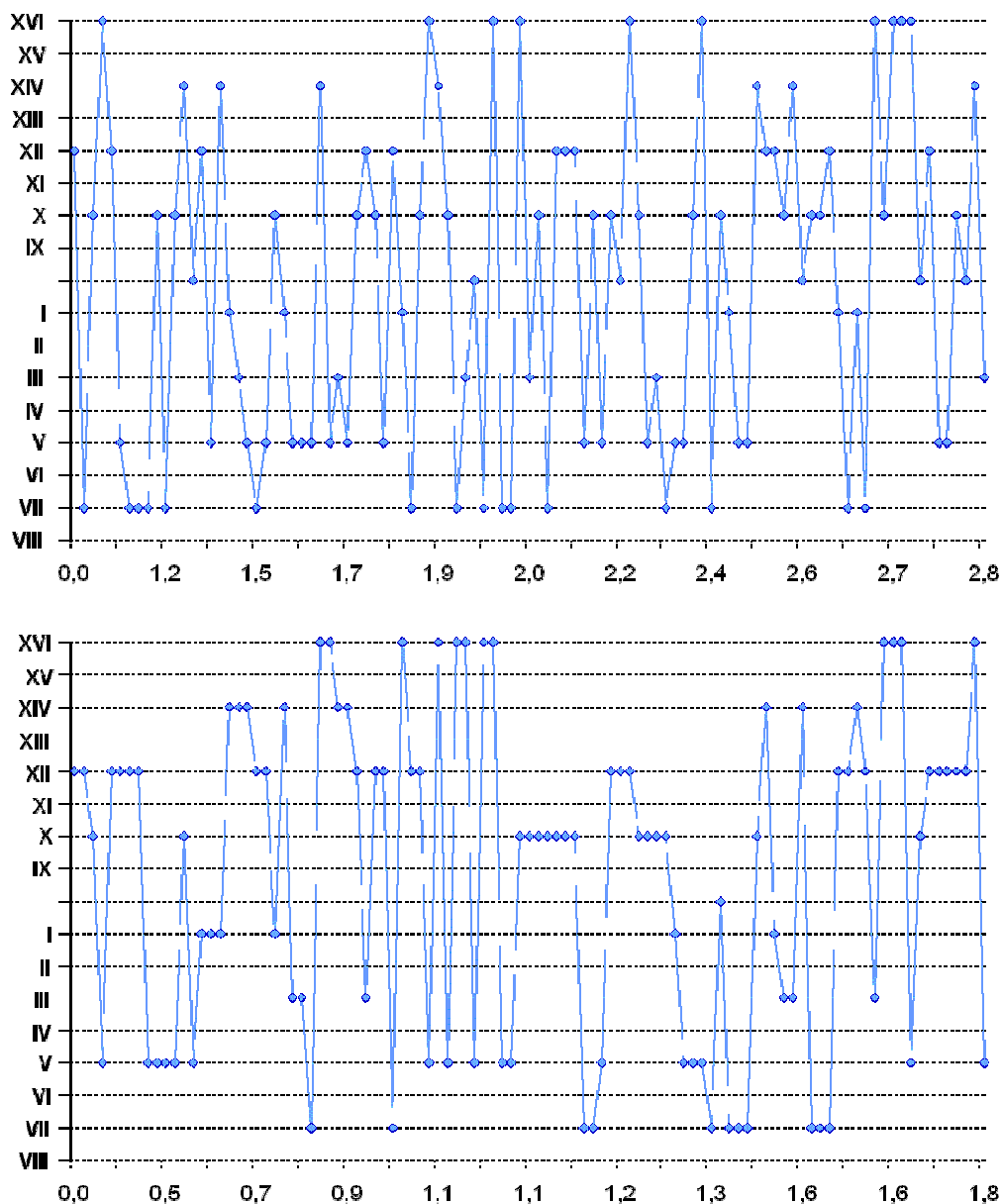
Cuando el plano del anillo aromático está alineado con alguno de estos sustituyentes, con un margen de $\pm 10^\circ$, también se ha hecho notar, destacando el lado del anillo que se alinea con el sustituyente (en rojo para el lado más cercano al primer sustituyente y en verde si es el opuesto a este). Cuando el plano del anillo aromático se alinea con el enlace C-C se produce una rotación del anillo, que se ha indicado en color morado. Cuando el lado del anillo que se eclipsa con el enlace C-C es el que está más cercano al primer sustituyente (C9-C10 del indol), esta rotación ocurre entre los tercios C-OH y C-H (cuña morada hueca) y cuando es el lado opuesto tiene lugar en el centro del tercio H-OH (cuña morada sólida). En este caso, las definiciones de zonas dependen de la estereoquímica absoluta de cada carbono del puente, ya que si se cambian el OH y el H, la zona C-H debe pasar a C-OH y viceversa.

También se han representado las transiciones que han tenido lugar entre una conformación y la siguiente. En el caso de los Monte Carlo estas transiciones no tienen significado, pero en las dinámicas moleculares indican qué procesos han tenido que ocurrir para pasar de una situación a la siguiente. Esto permite deducir la facilidad relativa con la que ocurren los procesos indicados, ayudando a la interpretación en términos moleculares de la apariencia de los espectros de RMN. Las transiciones consideradas han sido:

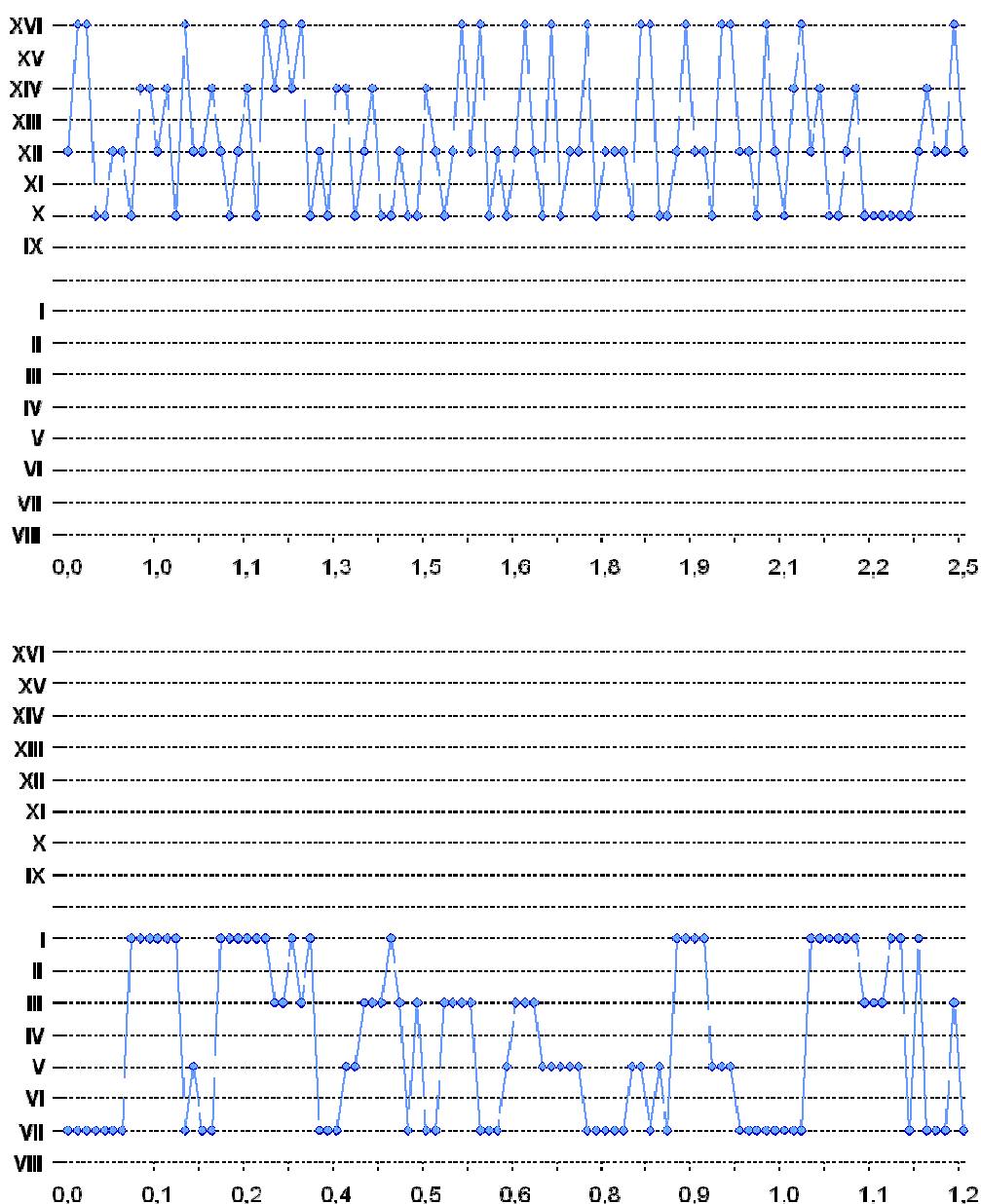
- El cambio de signo de la disposición sinclinal por rotación del enlace central del puente.
- La rotación de los anillos aromáticos (pasando el plano de los mismos por el plano definido por los carbonos del puente y el enlace que los une al anillo considerado: átomos $C_{\text{puente}}-C_{\text{puente}}-C_{\text{Ar}}$).
- El cambio de sector (al pasar el plano del anillo aromático por el plano que definen el enlace que une el anillo al puente y cada uno de los enlaces del carbono bencílico con sus sustituyentes).

III.4.B.2.a. Mecánica molecular. Análisis de resultados.

La aplicación de estas reglas al resultado de las búsquedas conformacionales realizadas para los compuestos **85**, **86**, **88** y **89** permite obtener gráficas en las que asignar y analizar las conformaciones.



Figuras 82a (arriba) y 82b (abajo). Asignación de las conformaciones más estables, obtenidas mediante Monte Carlo, del diol *cis* **85** (arriba) y del diol *cis* **88** (abajo), a los grupos conformacionales (I-XVI) establecidos previamente. Los grupos descritos están colocados de IX a XVI en la parte positiva del eje de ordenadas y de I a VIII en la parte negativa. El valor 0 se asigna a conformaciones que no corresponden a I-XVI.



Figuras 82c (arriba) y 82d (abajo). Asignación de las conformaciones más estables, obtenidas mediante Monte Carlo, del diol *trans* **86** (arriba) y del diol *trans* **89** (abajo), a los grupos conformacionales (I-XVI) establecidos previamente. Los grupos descritos están colocados de IX a XVI en la parte positiva del eje de ordenadas y de I a VIII en la parte negativa. El valor 0 se asigna a conformaciones que no corresponden a I-XVI.

Los resultados obtenidos al analizar las gráficas se resumen en la siguiente tabla, donde se indica a qué grupo pertenecen las conformaciones de mínima energía encontradas para cada compuesto, la diferencia de energía de cada una de ellas respecto al mínimo global y el número de veces que se ha encontrado dicha conformación tras 1000 etapas y con una diferencia de energía inferior a 5 kcal / mol respecto al mínimo global.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	Otras
85	1,5 (1)	-	1,5 (1)	-	0,8 (1)	-	0,2 (1)	-	-	0,5 (3)	-	0 (2)	-	1,3 (4)	-	0,7 (1)	-
88	0,6 (1)		0,8 (1)	-	0,1 (1)	-	0,8 (1)	-	-	0,1 (1)	-	0 (1)	-	0,7 (1)	-	0,9 (1)	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2 (1)	-	0 (1)	-	0,9 (5)	-	0,1 (3)	-
89	0,1 (2)		0,3 (3)		0,1 (2)		0 (1)		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 19. Resumen de los resultados del análisis conformacional para los compuestos **85**, **86**, **88** y **89**. En la parte superior de cada casilla se indica la mínima energía en kcal/mol de cada grupo conformacional respecto al mínimo global (sombreado oscuro), mientras que en la parte inferior se indica el número de veces que se ha encontrado dicha conformación de menor energía para cada grupo conformacional. En la columna de la derecha se indica si se han encontrado otras conformaciones intermedias a las definidas.

Tanto la tabla 19 como las figuras muestran que los compuestos con la misma estereoquímica relativa se comportan de manera muy similar. La principal diferencia observada es que en los dioles *trans*, **86** sólo adopta la disposición +SC y **89** la -SC. Esto se debe a que la estereoquímica absoluta de los modelos moleculares de **86** y **89** es la opuesta, de modo que las disposiciones +SC de **86** y -SC de **89** se corresponden con una disposición *gauche* de los hidroxilos del puente. Así pues, ambos resultados son coincidentes.

Los dioles *trans* se diferencian de los *cis* en que sólo una de las disposiciones sinclinales está presente en los primeros, mientras que en los segundos se observan las dos. Esto se debe a que en los dioles *trans* las dos conformaciones sinclinales son muy diferentes, una con los hidroxilos *gauche* y la otra con los hidroxilos *anti*. La preferencia por conformaciones con hidroxilos en disposición *gauche* observada en este trabajo está de acuerdo con trabajos anteriores y con la bibliografía.⁶⁰ En los dioles *cis*, las conformaciones sinclinales son más similares, lo cual está de acuerdo con que ambas estén igualmente pobladas.

Otro aspecto a destacar es que todas las conformaciones encontradas presentan una diferencia de energía pequeña con respecto a la del mínimo global, por lo que todas deben ser tenidas en cuenta en la interpretación de los espectros de RMN. Aunque el número de veces que la búsqueda conformacional ha encontrado la conformación de mínima energía de cada tipo conformacional es pequeño (como indica el número entre paréntesis en la tabla), el número de veces que el proceso encuentra conformaciones de ese tipo es elevado, como se aprecia en las gráficas. Esto sugiere que cada tipo conformacional está a su vez representado por conformaciones que difieren más entre sí que lo que diferían las conformaciones en las olefinas. Además, las pequeñas diferencias en energía sugieren que dichas conformaciones no difieren mucho en energía unas de otras. El hecho de que, en todos los casos en que están presentes, las conformaciones tipo XII sean las de menor energía es anecdótico, debido a las pequeñas diferencias en energía encontradas.

Si se considera que para los dioles con un anillo simétrico (**86** y **89**) las conformaciones I y III, V y VII, X y XII y XVI y XVI son estructuralmente idénticas, la diferencia de energía entre ellas nos informa del error intrínseco de la metodología empleada, al igual que se indicó en las olefinas.^{55b} En este caso las diferencias de energía observadas son menores que para las olefinas (aunque también el número de comparaciones efectuadas es menor), con diferencias inferiores a 0,7 kcal/mol en todos los casos. Posiblemente esto se debe a que la mayor flexibilidad de los dioles, comentada en el párrafo anterior, facilita la relajación de las estructuras intermedias generadas por la búsqueda conformacional y permite encontrar con más facilidad los mínimos locales.

También llama la atención en la tabla que de las conformaciones $-SC$ (I-VIII) sólo se observan aquellas con sentido helicoidal negativo (I, III, V y VII), mientras que para las $+SC$ (IX-XVI) sólo se observan las que tienen sentido helicoidal positivo (X, XII, XIV y XVI), tanto en los dioles *cis* como en los *trans*. A la vista de esta observación se han analizado los resultados de las búsquedas conformacionales en dioles no indólicos, habiéndose encontrado la misma situación. Así pues, la preferencia de los compuestos por conformaciones con igual signo de la disposición sinclinal y del sentido de giro de la hélice no es debida a la presencia del anillo de indol.

Para explicar esta preferencia resulta conveniente representar las moléculas con el enlace central del puente en el plano del papel, dirigido en dirección vertical y con el resto de la molécula situada por encima del papel. En esta disposición se observa que en las conformaciones en que el signo de la disposición sinclinal y el sentido de giro de la hélice difieren, los lados *endo* de los anillos aromáticos se dirigen hacia el hueco entre los anillos (representado, en la figura 83, por el elipsoide rosa situado entre la posición *orto-endo* de un anillo y la del otro). Esto reduce el hueco para el espaciador, en comparación con las combinaciones en que los signos coinciden, como se aprecia por el tamaño relativo de los elipsoides rosas. Además, como se aprecia en la figura 83, en la que se han omitido los grupos hidroxilo y los hidrógenos del puente para hacer un planteamiento general, independiente de la estereoquímica, este efecto es común para todas las configuraciones, de acuerdo con lo observado en las búsquedas conformacionales.

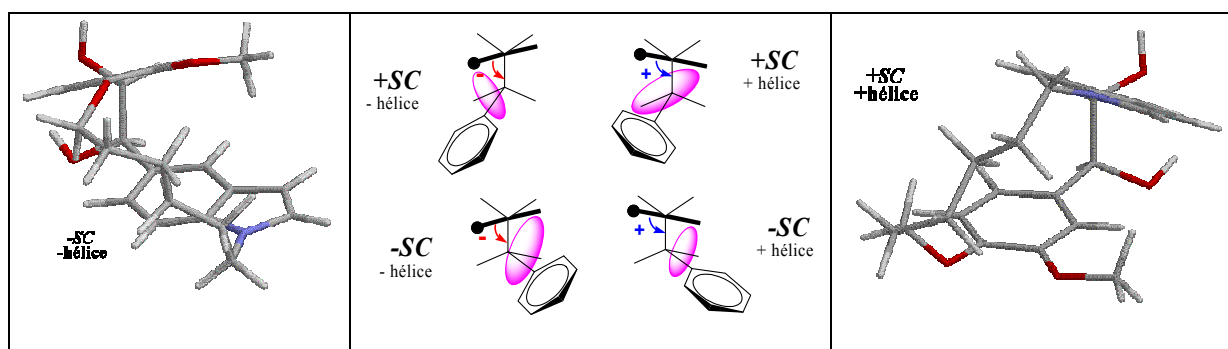


Figura 83. Representación del espacio (elipsoides rosas) entre los sustituyentes *endo* para las cuatro posibles combinaciones diferentes de sinclinal y helicidad. En los laterales se muestran dos conformaciones reales en los signos del sinclinal y la helicidad son coincidentes (- a la derecha, + a la izquierda).

Una vez analizados en conjunto los tipos conformacionales presentes, es posible analizar más detalladamente los resultados de la búsqueda conformacional, utilizando las gráficas en que se muestran con detalle las características de cada conformación.

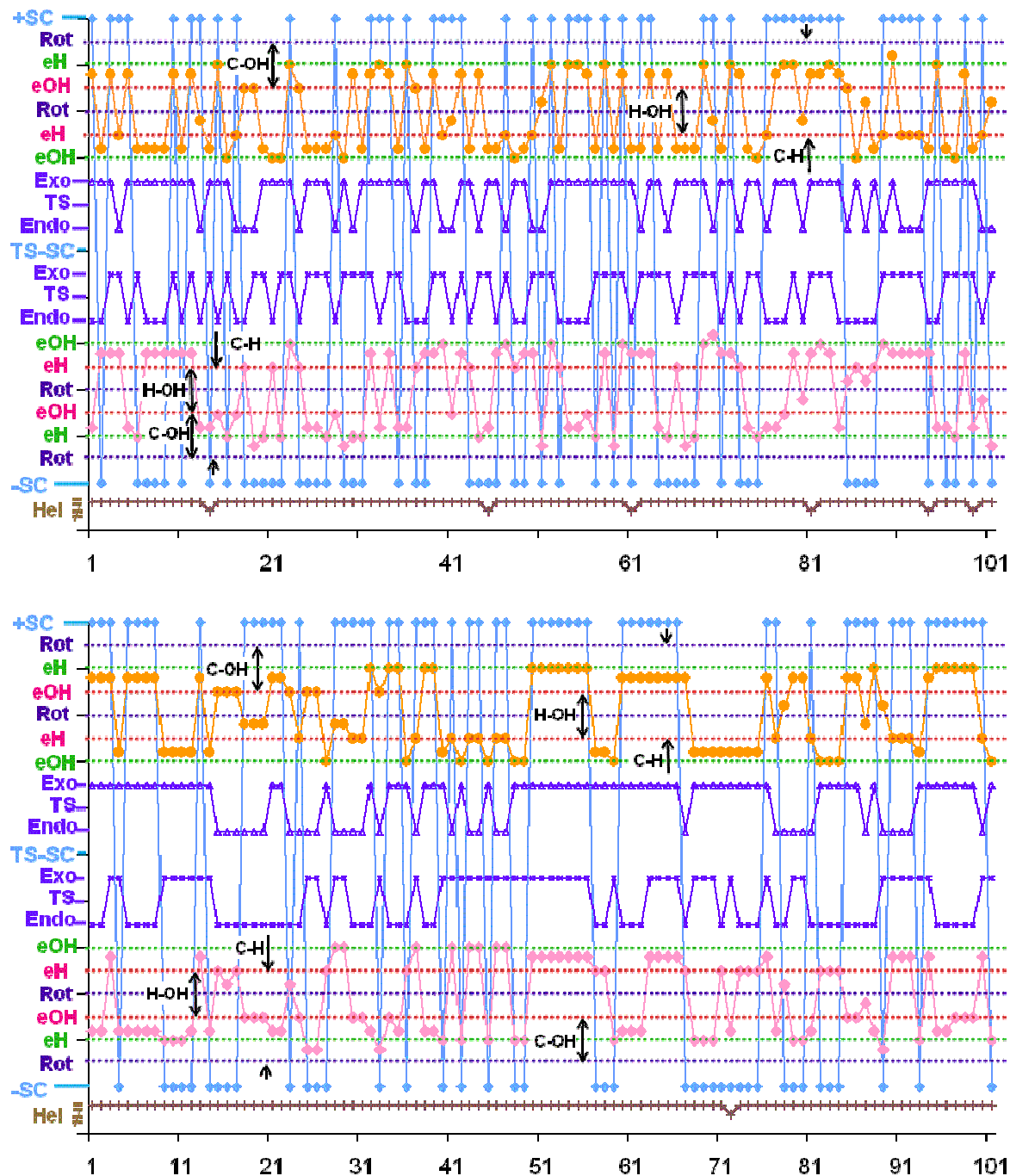


Figura 84a. Gráficas correspondientes a los dioles *cis* (85 arriba, 88 abajo) donde se representa, para cada conformación resultante del Monte Carlo, la disposición sinclinal (línea azul clara), la helicidad coincidente o discordante de los anillos (línea marrón), la orientación de los sustituyentes de cada anillo (líneas moradas, arriba indol y abajo fenilo) y la disposición de cada anillo en relación a los sustituyentes del carbono bencílico (líneas naranjas y arriba, indol; líneas rosas y abajo, fenilo).

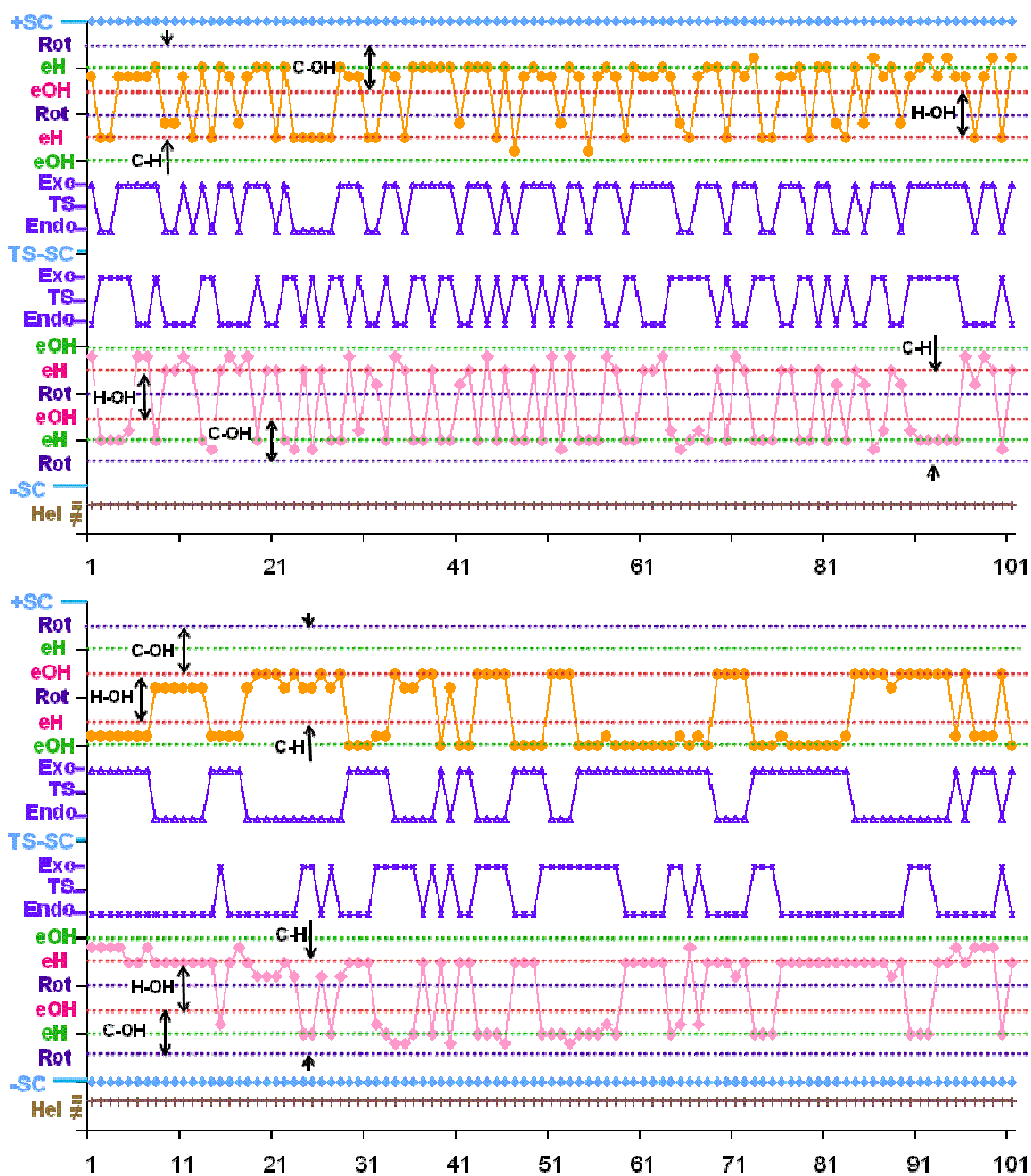


Figura 84b. Gráficas correspondientes a los dioles *trans* (86 arriba, 89 abajo) donde se representa, para cada conformación resultante del Monte Carlo, la disposición sinclinal (línea azul clara), la helicidad coincidente o discordante de los anillos (línea marrón), la orientación de los sustituyentes de cada anillo (líneas moradas, arriba indol y abajo fenilo) y la disposición de cada anillo en relación a los sustituyentes del carbono benílico (líneas naranjas y arriba, indol; líneas rosas y abajo fenilo).

En concordancia con lo indicado anteriormente, los dioles *cis* (figura 84a) muestran conformaciones +SC y -SC (línea de color azul claro), mientras que en los dioles *trans* (figura 84b) sólo se observa una de las dos (la que se corresponde con disposición *gauche* de los hidroxilos). Tanto en los dioles *cis* como en los *trans* se observan disposiciones *endo* de los dos anillos, como muestran las líneas de color morado.

En los compuestos que presentan un anillo tetrasustituido, la disposición *endo* del indol se observa en menor número de conformaciones que el *exo*. Esto sugiere que la presencia constante del sustituyente *endo* en los anillos tetrasustituídos dificulta la disposición *endo* del indol, probablemente por interacción del metoxilo en disposición *endo* con el espaciador. Esto está de acuerdo con el hecho de que las conformaciones *endo* del indol en los compuestos con anillos trisustituídos presentan menor energía cuando el metoxilo del otro anillo adopta una disposición *exo*, y con lo comentado en el apartado de las olefinas indólicas.

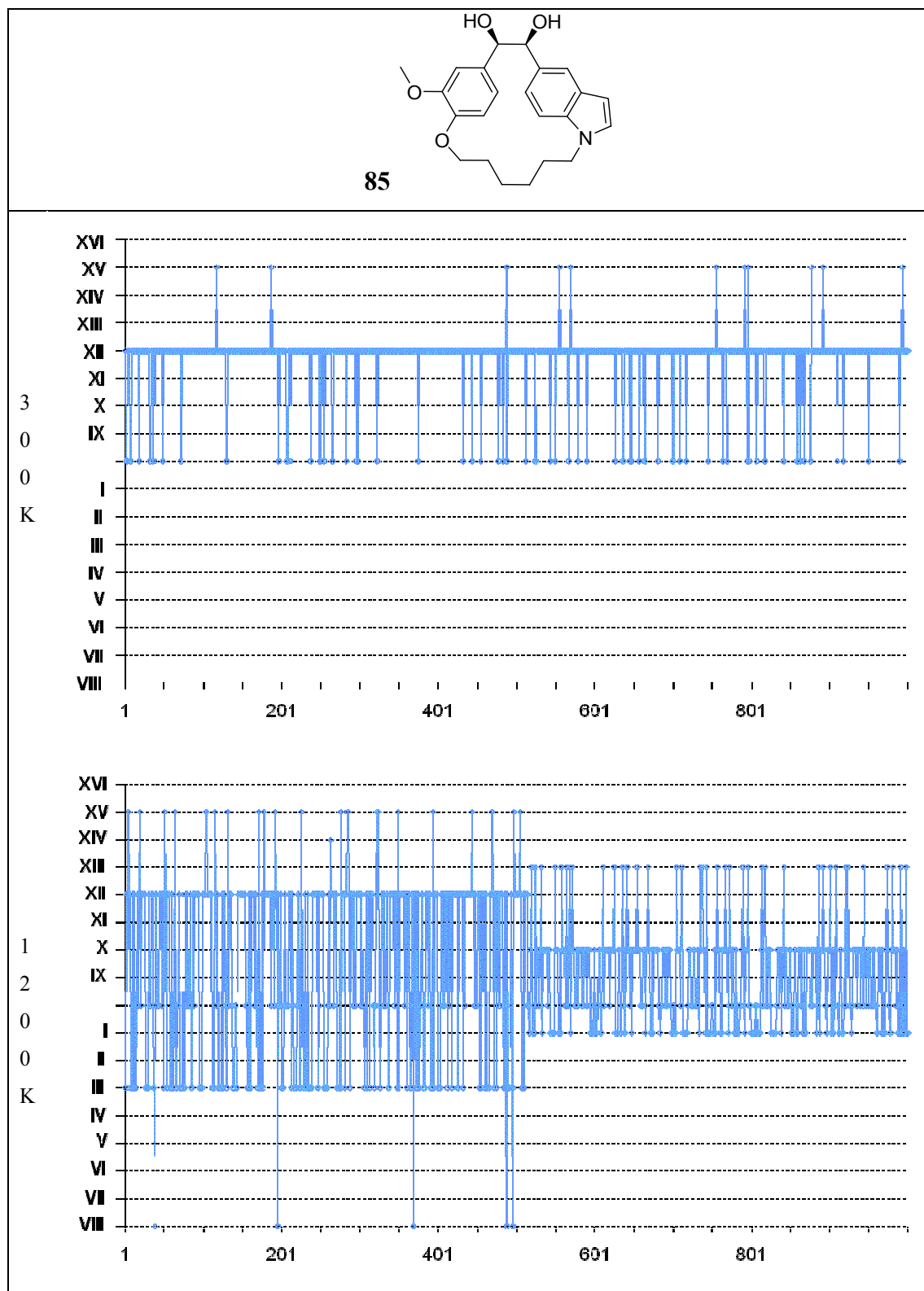
Tanto en los dioles *cis* como en los *trans* se aprecia que, en las conformaciones de baja energía, los dos anillos aromáticos tienen un sentido de giro de la hélice que coincide en signo. En principio, la mayor distancia entre los anillos aromáticos debida a las disposiciones sinclinales preferentes en los dioles podría permitir que los anillos no se colocaran en planos casi paralelos, pero esto parece ser una observación general.

El análisis de las líneas de color verde (correspondientes a la rotación de los planos de los anillos respecto a los sustituyentes del carbono bencílico) muestra que las conformaciones preferidas sitúan los planos de los anillos en los tercios C-OH y C-H, y dentro de ellos en los segmentos entre las conformaciones eclipsadas eH y eOH. En estas zonas se produce la transición de hélices + a hélices -, por lo que esta representación no es tan ilustrativa como el análisis de los grupos conformacionales antes comentada. Por otro lado, las preferencias observadas sugieren que las disposiciones más favorables alejan los planos de los anillos aromáticos del plano que forma el enlace central del puente y el enlace que une el puente con el anillo. Las disposiciones desfavorables dirigirían el anillo hacia el espacio intraanular, de modo que chocarían con el espaciador.

III.4.B.2.b. Dinámica molecular.

Con el fin de explorar las interconversiones entre las conformaciones se han llevado a cabo estudios de dinámica molecular a 300 y 1200K, empleando las mismas condiciones que las descritas para las búsquedas conformacionales utilizando Monte Carlo.

Los resultados de las dinámicas moleculares se han analizado de la misma forma que las búsquedas conformacionales y, además, se ha analizado la trayectoria de forma secuencial, comparando cada conformación con la que le sigue en la simulación para analizar si se han producido cambios en la disposición del puente (+SC a -SC y viceversa), rotaciones de los anillos (entendiendo por tales el paso del plano del anillo por el plano formado por los átomos $C_{\text{arom}}-C_{\text{puente}}-C_{\text{puente}}$) y cambios de segmento de los anillos (correspondientes a rotaciones de los anillos que atraviesan el plano $C_{\text{arom}}-C_{\text{puente}}-\text{Sustit H/OH}$. Figura 81). A medida que aumenta la temperatura de la simulación, se espera un aumento del número de transiciones y de la cantidad de conformaciones que no corresponden a los tipos conformacionales I-XVI. Para facilitar la comparación de experimentos a distintas temperaturas, en todos los casos las dinámicas moleculares para un mismo compuesto se han iniciado partiendo de la misma conformación.



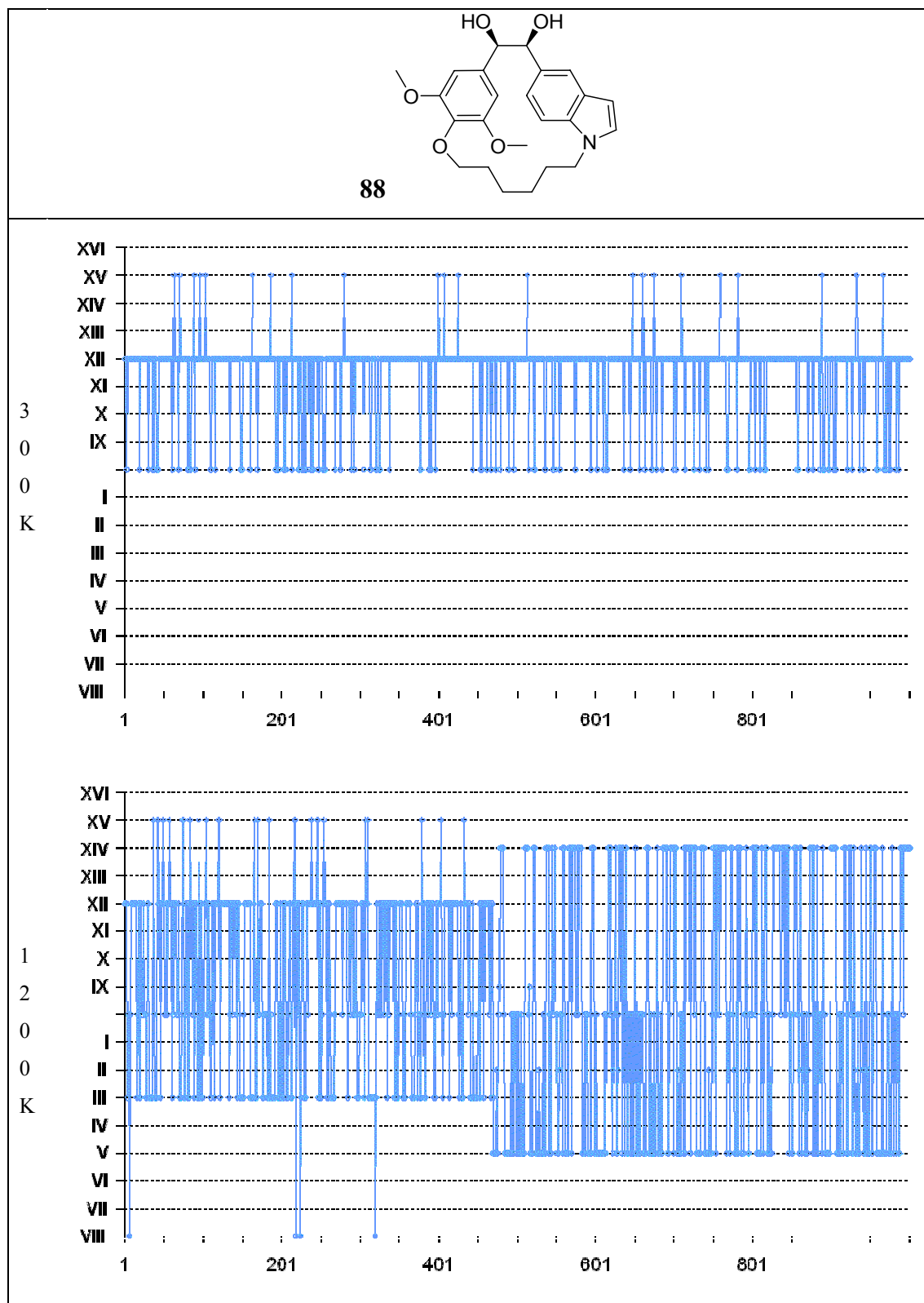
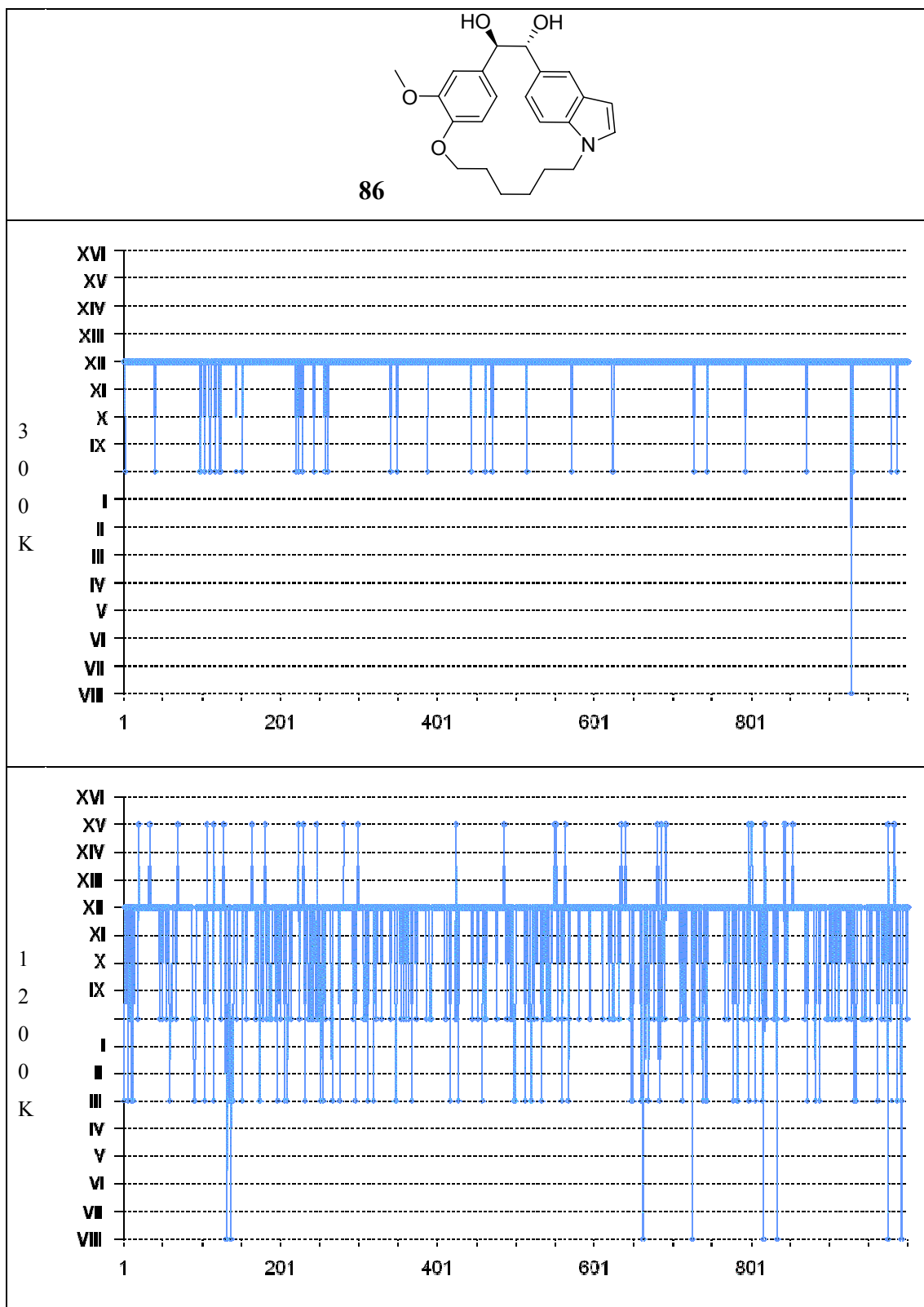


Figura 85a. Asignación de las conformaciones de los dioles *cis*, obtenidas mediante dinámica molecular, a los grupos conformacionales (I-XVI) establecidos previamente. La parte positiva del eje de ordenadas se corresponde con conformaciones +SC y la de abajo con las -SC. En el centro se sitúan las conformaciones que no corresponden a las clases I-XVI.



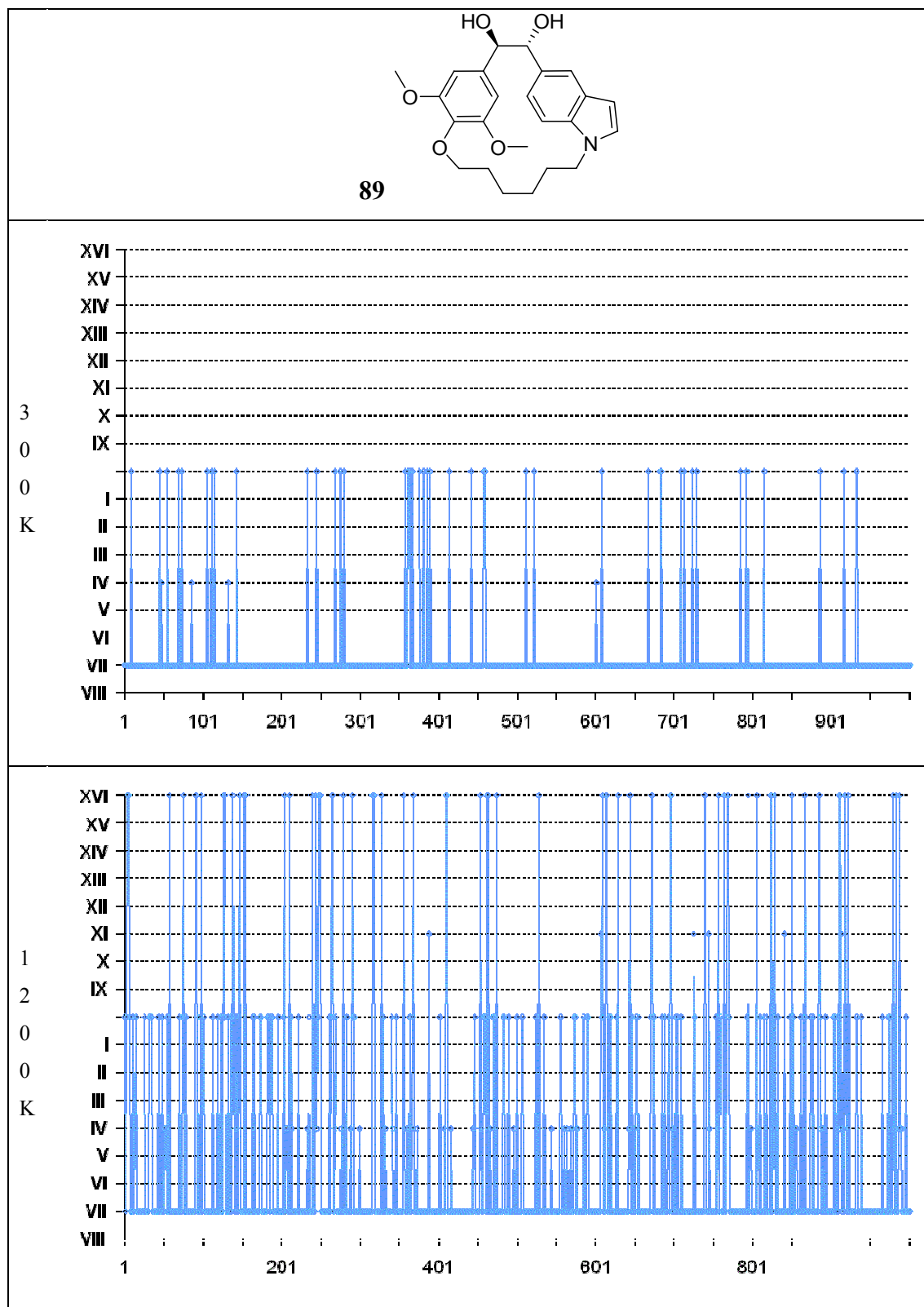


Figura 85b. Asignación de las conformaciones de los dioles *trans*, obtenidas mediante dinámica molecular, a los grupos conformacionales (I-XVI) establecidos previamente. Los grupos descritos están colocados de IX a XVI en la parte positiva del eje de ordenadas y de I a VIII en la parte negativa. En el centro se sitúan las conformaciones que no corresponden a las clases I-XVI.

El incremento de temperatura va asociado, en todos los casos, a un incremento en el número de estructuras que no corresponden con los tipos I-XVI, como era de esperar. La comparación de las dinámicas a 300K y 1200K para el mismo compuesto muestra que al aumentar la temperatura se incrementa el número de conformaciones accesibles. Las dinámicas moleculares para los compuestos con anillo trisustituido son muy similares a las de los que tienen anillo tetrasustituido. El análisis de las conformaciones accedidas a 300K y 1200K muestra conformaciones que no estaban presentes en la búsqueda conformacional, fundamentalmente conformaciones en que el signo de la disposición sinclinal y el del sentido de avance de la hélice para los anillos aromáticos difiere. De acuerdo con lo comentado en la búsqueda conformacional, estas conformaciones se encuentran ocupadas con menor frecuencia, lo que indica su mayor inestabilidad. Por otra parte, la facilidad (representada por la alta frecuencia) con que se produce el paso (incluso a 300K) sugiere que la barrera energética entre ambas es pequeña.

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	Alt
85	MC	X	-	X	-	XX	-	XX	-	-	XX	-	XX	-	X	-	X	-
	300K												XX			x		0
	1200K	X		X					x		XX		XX	x		x		0
88	MC	XX		XX	-	XX	-	XX	-	-	XX	-	XX	-	XX	-	XX	-
	300K												XX			x		0
	1200K	X		X					x		XX		XX	x		x		0
86	MC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	XX	-	XX	-	XX	-	XX	-
	300K								x				XX					0
	1200K			X					x				XX			x		0
89	MC	XX		XX		XX		XX		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	300K				x			XX										0
	1200K				x			XX				x					X	0

Tabla 20. Resumen de las conformaciones obtenidas a partir del Monte Carlo y de las dinámicas moleculares para los compuestos **85**, **86**, **88** y **89**. En la columna de la derecha se indica si se han encontrado otras conformaciones intermedias a las definidas.

A 300K las únicas transiciones observadas son las asociadas al cambio de sentido de la hélice de los anillos aromáticos, que interconvierten XII y XV (en los dioles *cis* y en **86**) y VII y IV (en **89**). A temperaturas superiores aparecen nuevas transiciones (que se analizarán posteriormente) y que permiten observar otras transiciones de este tipo, como son las que intercambian III y VIII (**89**) y X y XIII (dioles *cis* y **86**). Para facilitar la inspección detallada de los cambios entre tipos conformacionales se ha ampliado la gráfica correspondiente a la dinámica molecular de **85** a 1200K (figura 86).

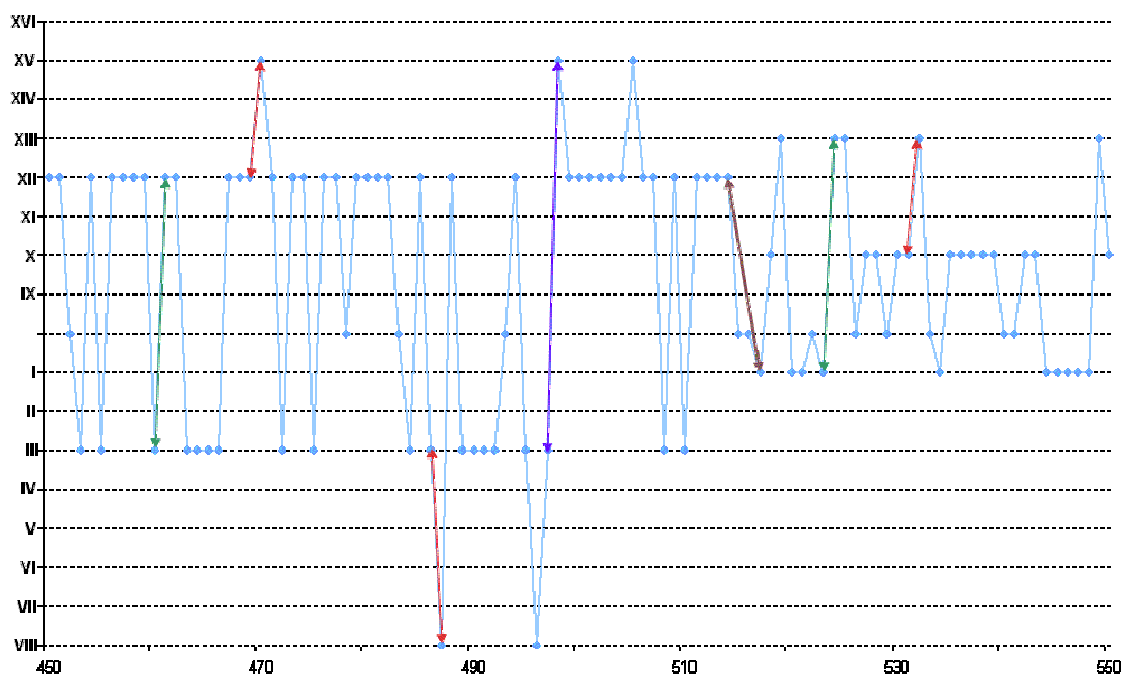


Figura 86. Ampliación de la dinámica molecular a 1200 K del compuesto **85**. En morado se indican cambios de la disposición sinclinal (giro del puente), en rojo cambios de helicidad, en verde cambios simultáneos en la disposición sinclinal y en la helicidad y en marrón el cambio infrecuente de la conformación XII a la I, que implica el cambio de disposición sinclinal, de helicidad y la rotación del anillo trisustituido.

En ella se observa, que las transiciones más frecuentes a 1200K son cambios en la disposición sinclinal del puente acompañadas de cambio de helicidad (indicadas en color verde), como son las transiciones entre XII y III o entre X y I. Estos cambios se traducen en la gráfica en pasos de la mitad inferior a la superior y viceversa.

El cambio de disposición sinclinal convierte las posiciones *endo* en *exo* y viceversa, sin que se produzca la rotación de los anillos. Como se ha indicado, las transiciones observadas mayoritariamente implican no sólo la rotación del puente, sino también el cambio de sentido de giro de la hélice de los anillos aromáticos hacia la conformación más estable (+*SC* y hélice+ ó -*SC* y hélice-) que se produce por giro parcial de los anillos, por lo que este cambio de helicidad debe ser más rápido que el giro del puente, como se ha discutido anteriormente. Así, en ocasiones, ambos procesos no ocurren simultáneamente y se observa el cambio de conformación por giro del puente (cambio de *SC*) y antes de que cambie el sentido helicoidal (indicado por las flechas de color morado), como por ejemplo en el paso de III a XV.

En las dinámicas moleculares de los dioles *cis* a 1200K, además de las transiciones de alta frecuencia ya mencionadas se producen transiciones que ocurren con baja frecuencia (una vez en 3 ns de simulación) y que permiten acceder a nuevos tipos conformacionales. Estas transiciones son apreciables en la gráfica completa de la simulación porque se produce un claro cambio en el patrón de las mismas.

La baja frecuencia de dichas transiciones hace que no sea posible comparar las poblaciones de ambos tipos conformacionales para deducir su estabilidad relativa, ya que el proceso de retorno a las conformaciones iniciales es también infrecuente y no se produce durante el resto del tiempo de la simulación, por lo que no puede compararse con los resultados del Monte Carlo. En el caso de **85**, esta transición se produce al pasar de la conformación XII a la conformación I (indicado por una flecha marrón en la ampliación). En realidad, esta transición implica un paso del grupo de conformaciones **C** (XII-XV-III-VIII) al grupo **A** (I-VI-X-XIII). La conformación VI, aunque no observada, se ha incluido en el grupo puesto que se generaría por el mismo tipo de transiciones que convierten XII en XV, III en VIII y X en XIII. Puesto que I es menos estable que X, como muestra su menor número de apariciones, la existencia de VI debe ser demasiado efímera para ser recogida, pero la facilidad propuesta para los cambios de helicidad nos hace suponer que debe estar presente.

La transición de XII a I implica un cambio de disposición sinclinal y helicidad ya mencionados como procesos frecuentes, pero además implica una rotación del anillo trisustituido, como confirma el hecho de que un nuevo cambio en la disposición sinclinal (más el giro sin rotación de los anillos) genere X, que sólo se diferencia de XII en la disposición del metoxilo (*exo* para X y *endo* para XII).

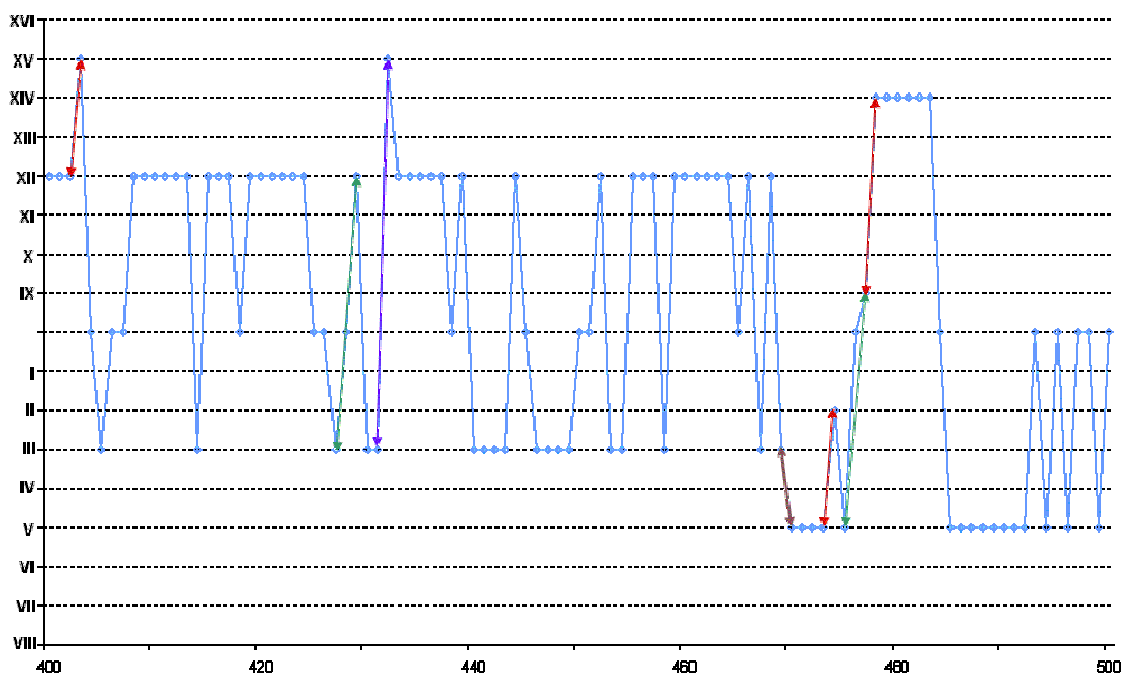


Figura 87. Ampliación de la dinámica molecular a 1200 K del compuesto **88**. En morado se indican cambios de la disposición sinclinal (giro del puente), en rojo cambios de helicidad, en verde cambios simultáneos en la disposición sinclinal y en la helicidad y en marrón el cambio infrecuente de la conformación III a la V, que implica solamente la rotación del anillo de indol.

En el caso del diol *cis* con un anillo tetrasustituido, **88**, se observa el paso del conjunto **C** (XII-XV-III-VIII) al conjunto **D** (XIV-IX-V-II), mediante la transición de III a V (figuras 77 y 87). En este caso, la transición implica solamente la rotación del anillo de indol. El carácter simétrico del anillo tetrasustituido hace que los conjuntos de conformaciones **C** (XII-XV-III-VIII) y **A** (X-XIII-I-VI) y los conjuntos **D** (XIV-IX-V-II) y **B** (XVI-XI-VII-IV) sean estructuralmente iguales, por lo que se puede considerar que la dinámica muestrea todas las conformaciones propuestas para él.

La baja frecuencia de las rotaciones de los anillos no permite establecer la facilidad relativa con que tienen lugar. Sin embargo, su mera ocurrencia sugiere que las rotaciones del indol y del anillo trisustituido pueden ocurrir con relativa facilidad. Estructuralmente, parece razonable, ya que ambos pueden rotar dirigiendo hacia el espacio intraanular átomos de hidrógeno. Por el contrario, estructuralmente parece más difícil que rote el anillo tetrasustituido, puesto que requeriría pasar un grupo metoxilo por el espacio intraanular. En los dioles *trans* no se observan rotaciones de los anillos aromáticos.

Las conclusiones extraídas del análisis de los estudios de dinámica molecular están de acuerdo con las consideraciones propuestas inicialmente para analizar los equilibrios conformacionales de los dioles, basadas en desglosar la movilidad de las moléculas en cuatro posibilidades (figura 70, pág. 140): a) **rotación del anillo de indol (A)**, b) **rotación del otro anillo (B)**, c) **rotación del puente**, que conlleva el cambio entre las dos conformaciones *sinclinales* entre los dos restos fenilo, y d) **cambio del sentido helicoidal** de los anillos. Además, es posible establecer un orden relativo de facilidad de los cuatro elementos: $d > c > a \sim b$ (TR) $> b$ (QR). Este orden también está de acuerdo con los planteamientos iniciales.

III.4.B.3. Justificación de la apariencia de los espectros de RMN de dioles y sus diacetatos.

III.4.B.3.a. Giro rápido del puente-Interconversión conformaciones sinclinales.

Si las transiciones tipo **d** y **c** son rápidas en la escala de tiempo de la resonancia, los equilibrios conformacionales propuestos para los dioles *cis* y *trans* se pueden considerar como equilibrios entre 4 conjuntos de conformaciones. A su vez, estos conjuntos de conformaciones pueden considerarse integrados por una conformación prioritaria en el caso de los dioles *trans* (la conformación sinclinal con los hidroxilos *gauche* con su sentido de hélice preferido) y por dos en los dioles *cis* (correspondientes a las dos conformaciones sinclinales con su sentido helicoidal preferido). El aspecto de los espectros vendrá, pues, condicionado por las rotaciones de los anillos de indol y bencénicos.

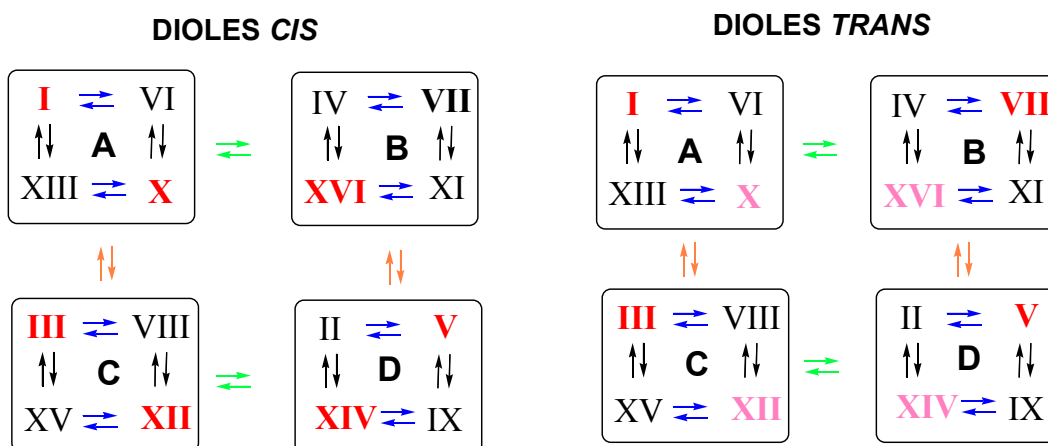


Figura 88. Conjuntos de conformaciones para los dioles *cis* y *trans* que se interconvierten entre ellos por **rotaciones** del anillo **indólico** (flechas verdes) o del **anillo bencénico** (flechas naranjas). Cada conjunto está formado por cuatro conformaciones que se interconvierten por transiciones rápidas en la escala de tiempo de RMN: rotación del puente (flechas negras) y cambio de helicidad (flechas azules). Las conformaciones prioritarias de cada conjunto se indican en rojo (rosa para el diol *trans* **86**): una en los dioles *trans* (conformación en la que los hidroxilos están en *gauche* y la disposición sinclinal coincide con su helicidad preferida) y dos conformaciones en los dioles *cis* (correspondientes a las dos conformaciones en las que el signo de la disposición sinclinal y la helicidad coinciden).

En cada conjunto de conformaciones, la situación de los sustituyentes en los anillos aromáticos (el metoxilo y los metinos aromáticos del anillo bencénico y los metinos del anillo de pirrol -P- y bencénicos del indol) se puede describir como un promedio (intercambio rápido) entre las situaciones que más contribuyen al equilibrio (marcadas en rojo/rosa).

Así, se observa que en los dioles *cis* los metinos del anillo de indol (P, en las figuras 89-96, que es equivalente a Indol C9-10 de las figuras 74-77) y los metoxilos se encuentran promediados entre una situación *endo* y una *exo* en cada uno de los conjuntos de conformaciones (en intercambio rápido). Por el contrario, los dioles *trans*, con una sola conformación como principal contribuyente al equilibrio, los presentan en una única situación en cada equilibrio. En consecuencia, es de esperar que, para cada conjunto de conformaciones, las señales correspondientes a los elementos indicados en los espectros de RMN de los dioles *cis* correspondan a situaciones promediadas, mientras que en los dioles *trans* correspondan a situaciones más extremas. En otras palabras, es de esperar que las situaciones que pueden interconvertirse por rotación de los anillos aromáticos en los dioles *cis* sean más similares (en desplazamiento químico) que las correspondientes a los dioles *trans*.

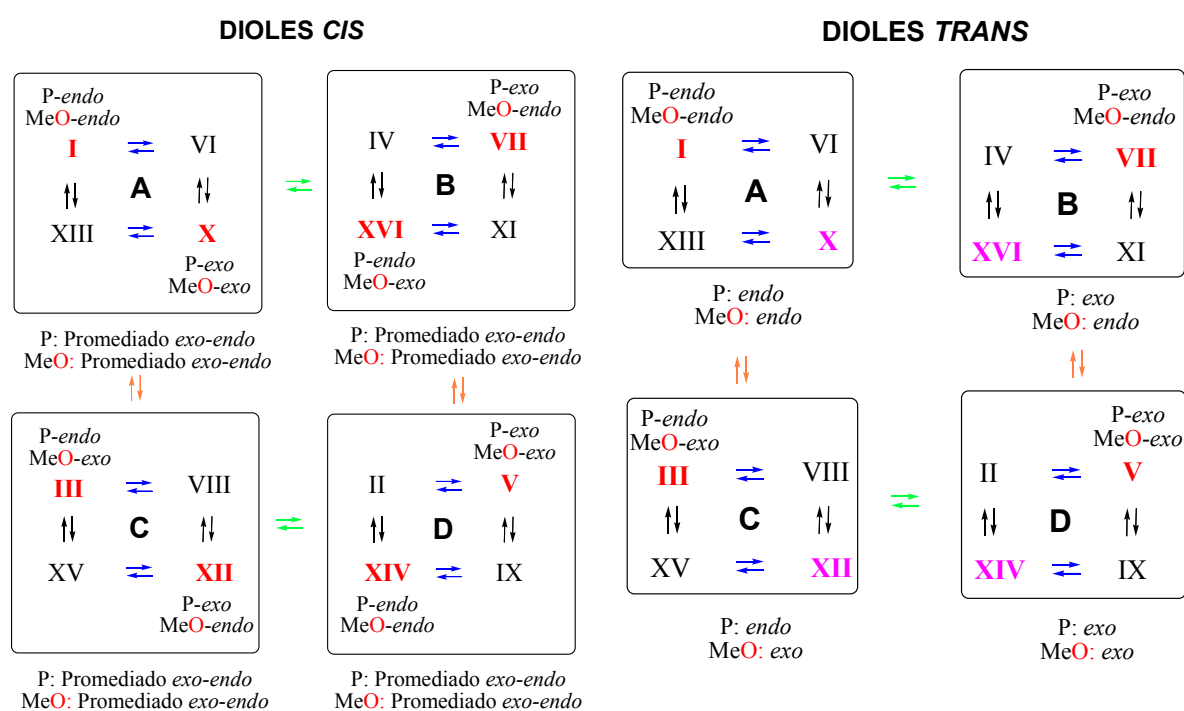


Figura 89. Conjuntos de conformaciones para los dioles *cis* y *trans* que se interconvierten entre ellos por rotaciones del anillo **indólico** (flechas verdes) o del **anillo bencénico** (flechas naranjas). En cada conjunto se ha indicado la disposición *endo* o *exo* del metoxilo (MeO) y de los hidrógenos del anillo pirrólico del indol (P, equivalente a Indol C9-C10 de las figuras 74-77) para las conformaciones prioritarias. Las disposiciones indicadas en el diol *trans* son las correspondientes al diol **89**.

Además, en los dioles simétricos los conjuntos de conformaciones **A** y **C** y **B** y **D** son estructuralmente indistinguibles, por lo que el número de conformaciones a considerar en el equilibrio se reduce aún más, dependiendo el aspecto de los espectros únicamente de la rotación de los anillos de indol. Al ser el anillo tetrasustituido simétrico, el anillo de indol se encuentra en entornos similares, se encuentre a un lado u otro del mismo, por lo que el efecto de la rotación del indol es menos apreciable y se requiere una menor frecuencia para promediar las señales del mismo. Sin embargo, los dos lados del anillo simétrico sí que se encuentran en entornos muy diferentes dependiendo de su disposición, lo que justifica la presencia de señales diferentes para núcleos químicamente equivalentes. Así, las principales diferencias (excluyendo las originadas por la existencia de diferentes sistemas de spines) entre los espectros de los compuestos tri- y tetrasustituidos se deberán a que el efecto de la rotación del indol es más fácilmente apreciable en los primeros.

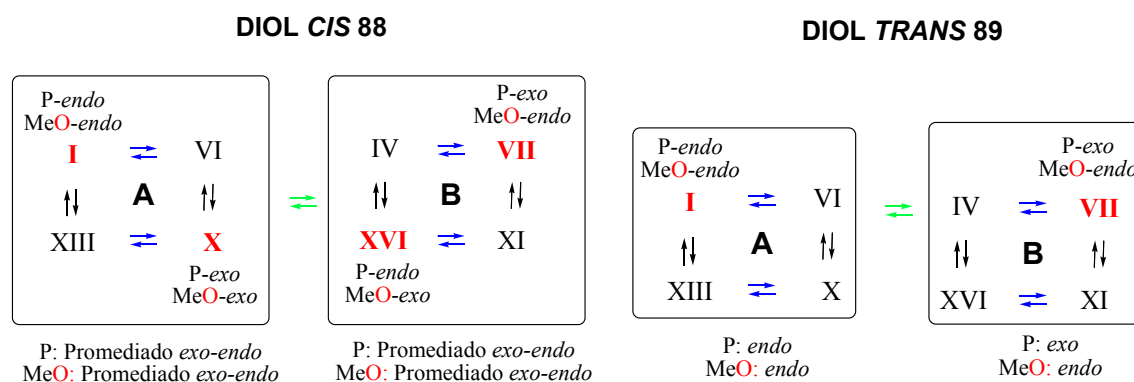


Figura 90. Conjuntos de conformaciones a considerar en los compuestos en los que el anillo benzénico es simétrico (**88** y **89**), ya que A=C y B=D.

Por tanto, para intentar explicar la apariencia de los espectros de RMN de los dioles, habrá que considerar cuatro conjuntos de conformaciones (**A**, **B**, **C** y **D**) para los que presentan un anillo trisustituido y dos (**A** y **B**, por ejemplo) para los que presentan un anillo benzénico tetrasustituido simétrico.

Las situaciones susceptibles de ser intercambiadas por rotación de los anillos son más similares en los dioles *cis* que en los *trans*. Las dinámicas moleculares indican que las rotaciones de anillos son más fáciles en los dioles *cis* que en los isómeros *trans*. Además, los experimentos de dinámica molecular sugieren que las rotaciones de los dos anillos para los que presentan un anillo trisustituido son factibles, mientras que en los que presentan un anillo benzénico tetrasustituido simétrico la rotación del anillo tetrasustituido debe ser más infrecuente.

Teniendo todo lo anterior en cuenta, el sistema más simple debe ser el diol **89**. Sus espectros de RMN muestran un único juego de señales, resonando los núcleos químicamente equivalentes del anillo tetrasustituido a frecuencias distintas. En principio, considerando lo expuesto hasta el momento, para el diol **89** cabría esperar la existencia de dos juegos de señales con los núcleos químicamente equivalentes del anillo tetrasustituido resonando a frecuencias distintas. La presencia de un único juego de señales puede ser el resultado de al menos una de las dos siguientes posibilidades (figura 91): una rotación rápida del indol, que promediaría las poblaciones **A** y **B**, o una contribución diferente de las poblaciones **A** y **B** al espectro, que se produciría si uno de los dos conjuntos de conformaciones estuviese menos poblado que el otro.

La rotación rápida del indol (no observada en las dinámicas moleculares) daría lugar a que todas las conformaciones formaran un único conjunto conformacional en intercambio rápido. Sin embargo, el hecho de que la naturaleza simétrica del anillo tetrasustituido haga que los subconjuntos **A** y **C** y **B** y **D** sean indistinguibles no implica que sus metoxilos ni los metinos estén en el mismo entorno magnético, explicando la existencia de dos señales para las parejas de núcleos químicamente equivalentes. Por otra parte, los resultados del Monte Carlo sugieren que las conformaciones de menor energía de ambos conjuntos de conformaciones (I y VII y sus idénticas III y V) son muy próximas en energía, lo cual no estaría de acuerdo con el predominio de una de ellas.

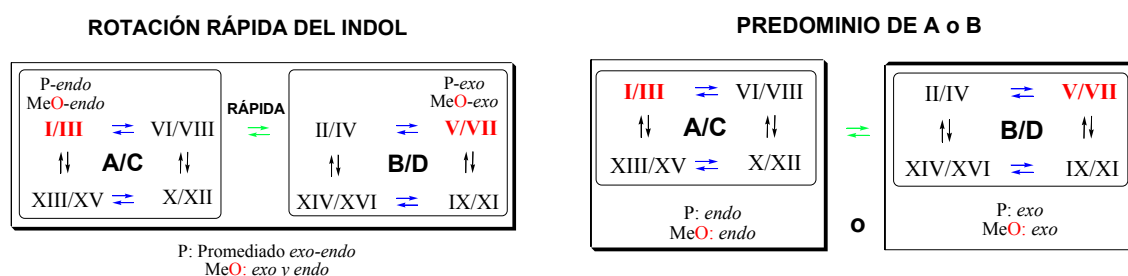


Figura 91. Posibilidades que justificarían la presencia de un solo juego de señales en los espectros de RMN del diol *trans* **89**.

Los espectros de RMN del diol *trans* **86** son muy similares a los de **89**, lo que sugiere un comportamiento similar. Sin embargo, la consideración de los equilibrios para **86** sugiere que, para alcanzar una situación equivalente a la de **89**, las rotaciones de los dos anillos deben ser lo suficientemente rápidas en la escala de tiempo de la resonancia como para promediar las señales correspondientes a los grupos **A**, **B**, **C** y **D**. Si esto no fuera así, habría dos juegos de señales por cada anillo cuya rotación fuera lenta. El desplazamiento químico del grupo metoxilo, intermedio entre los metoxilos *endo* y *exo* del compuesto **89**, está de acuerdo con esta situación.

Los espectros de RMN del diol *cis* **88** presentan dos juegos diferenciados de señales, en proporción aproximada 2:1. Esta diferencia en energía, y más si intervienen cuatro posibles conformaciones, no puede ser discriminada por la mecánica molecular. En la dinámica molecular, además, la naturaleza infrecuente de la transición entre los dos conjuntos de poblaciones no permite establecer comparaciones de ocupación de los estados. Si se considera la naturaleza simétrica del anillo no indólico y que la rotación del indol es rápida y la del anillo tetrasustituido no, todas las conformaciones están en equilibrio rápido, lo que no justificaría la existencia de dos juegos de señales en el espectro (figura 92). La consideración de que la rotación del anillo de indol sea lenta en principio solucionaría el problema, ya que el equilibrio a considerar es el que se establece entre **I/III-VI/VIII-X/XII-XIII/XV** y **II/IV-V/VII-IX/XI-XIV/XVI**, siendo los tipos conformacionales en rojo los más representativos.

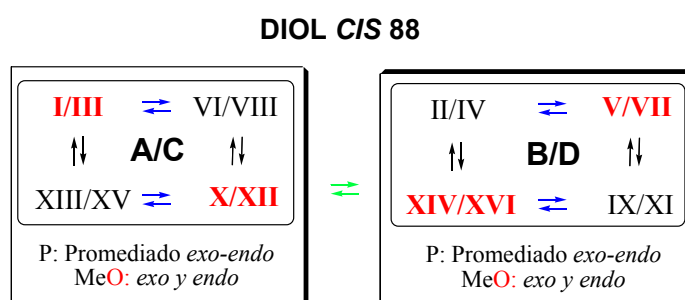
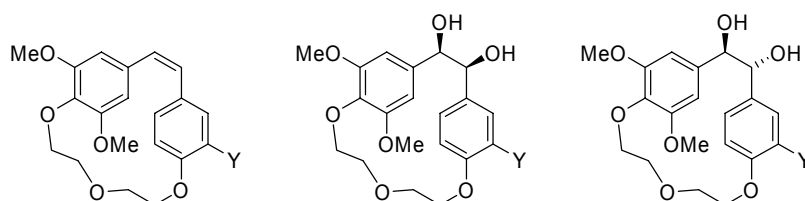


Figura 92. Grupos conformacionales a considerar en el diol *cis* **88** y disposición de los sustituyentes de los anillos en cada grupo si se considera que la rotación del puente y el cambio de helicidad son rápidos en la escala de tiempo de RMN.

Sin embargo, el análisis detallado de los desplazamientos químicos del diol **88** muestra que, en contra de lo esperado para un intercambio rápido entre conformaciones + y – *sinclinales*, los núcleos químicamente equivalentes se encuentran en entornos magnéticos muy diferentes, como se muestra en la tabla 21.



Compuesto	Tipo de puente	MeO	CH	Δ_{OMe}	Δ_{CH}
Y = H	Olef	3,62 / 3,62	5,93 / 5,93	0	0
	Diol-cis	3,63 / 3,62	6,19 / 5,67	0,01	0,51
	Diol-trans	3,70 / 3,39	6,47 / 5,39	0,31	1,08
Y = OH	Olef	3,65 / 3,65	6,13 / 6,13	0	0
	Diol-cis	3,68 / 3,64	6,25 / 5,87	0,04	0,37
		3,71 / 3,60	6,39 / 5,70	0,09	0,69
	Diol-trans	3,83 / 3,49	6,54 / 5,49	0,34	1,05
3,85 / 3,55		6,55 / 5,64	0,30	0,91	
87	Olef	3,45 / 3,45	6,05 / 6,05	0	0
88	Diol-cis	3,86 / 3,00	6,23 / 5,89	0,86	0,34
		3,81 / 3,00	6,77 / 5,32	0,81	1,45
89	Diol-trans	3,86 / 2,97	6,66 / 5,87	0,89	0,79

Tabla 21. Desplazamientos químicos de los metoxilos y metinos (y las diferencias entre cada pareja químicamente equivalente) del anillo simétrico de los compuestos **87**, **88** y **89** y de los compuestos que se muestran encima de la tabla.

Así, la diferencia de desplazamiento químico de los dos metoxilos del anillo tetrasustituido es muy similar en los dos dioles. La diferencia de desplazamiento químico de los metinos aromáticos del anillo tetrasustituido en la población mayoritaria del diol *cis* es menor que en el *trans*, lo que estaría de acuerdo con un equilibrio conformacional, pero en la minoritaria esta diferencia es incluso superior a la observada en el diol *trans*. Estos datos sugieren una interpretación diferente de la anteriormente expuesta, según se discute en el apartado siguiente.

III.4.B.3.a. Giro lento del puente. Interconversiones lentas de conformaciones sinclinales.

Manteniendo el cambio de helicidad como transición más favorable (rápida) y de acuerdo con los cálculos de las dinámicas moleculares a 300 K, se puede proponer la existencia de un giro rápido del anillo de indol y una interconversión lenta entre las conformaciones sinclinales, con lo que el equilibrio conformacional podría resumirse como se muestra en la figura siguiente (Figura 96 para el compuesto **89**).

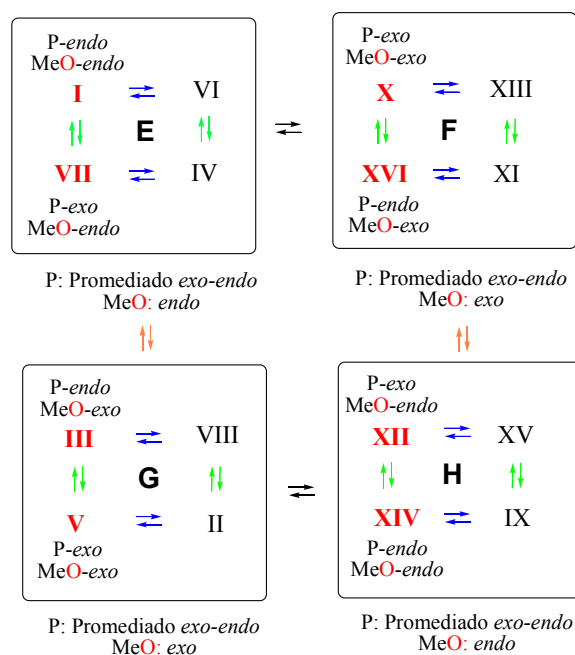


Figura 93. Conjuntos conformacionales para los dioles *cis* que resultan de considerar rápidas las transiciones debidas al **cambio de helicidad (flechas azules)** y la **rotación del indol (flechas verdes)**. Los cambios entre estos grupos se producirían mediante las transiciones (más lentas) debidas a la **rotación del anillo tetrasustituido (flechas naranjas)** y a la **rotación del puente (flechas negras)**.

Si reconsideramos la situación con un anillo simétrico (**E=G** y **F=H**, figura 94), para el diol *cis* quedan dos equilibrios, uno correspondiente a disposiciones + sinclinales y el otro – sinclinales. Para el diol *trans*, las mismas consideraciones llevarían a tomar en consideración un único equilibrio (aquel con los alcoholes del puente *gauche*), ya que el otro sería menos estable. Además, en ambas situaciones la rotación del anillo tetrasustituido sería lenta, por lo que sus núcleos químicamente equivalente darían señales diferentes. Tal y como se muestra en el esquema, los núcleos químicamente equivalentes estarían en entornos muy distintos en el conjunto de conformaciones en equilibrio, por lo que sus desplazamientos químicos serían bastante extremos tanto en el diol *cis* como en el *trans*, de acuerdo con lo observado.

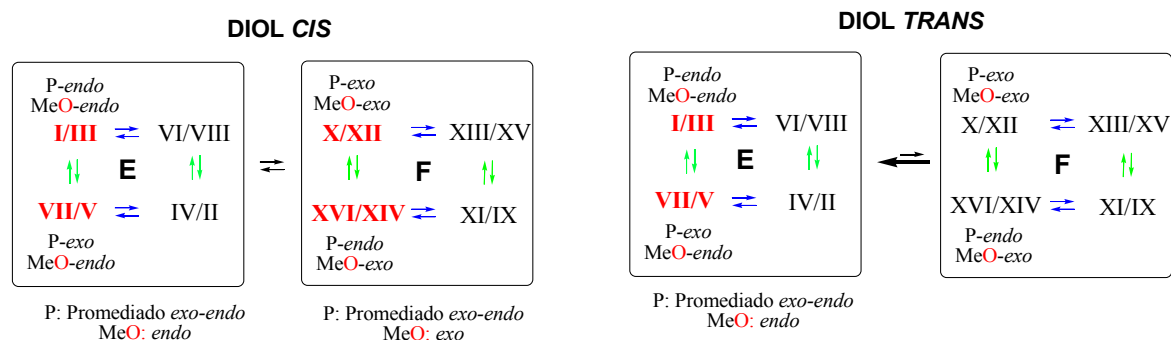


Figura 94 Conjuntos conformacionales para los dioles **88** y **89** que resultan de considerar rápidas las transiciones debidas al **cambio de helicidad (flechas azules)** y la **rotación del indol (flechas verdes)**. Los cambios entre estos grupos se producirían mediante las transiciones (más lentas) debidas a la **rotación del anillo tetrasustituido (flechas naranjas, no mostradas, ver figura 93)** y a la **rotación del puente (flechas negras)**. Los conjuntos G y H no se consideran ya que E=G y F=H. En rojo se han resaltado las conformaciones preferidas, para las que los signos de la disposición sinclinal y la helicidad son coincidentes. MeO-endo o MeO-exo hacen referencia a la situación dekl grupo MeO- señalado en azul para la primera conformación indicas (I, VII, etc) o en color negro para la segunda (II, V, etc).

Como se ha indicado antes, la consideración de los equilibrios para **86** sugiere que, para alcanzar una situación equivalente a la de **89**, la rotación del otro anillo debe ser lo suficientemente rápida como para promediar las señales correspondientes a los grupos **F** y **H** (figura 95, izquierda) o debe existir el predominio de una frente a otra (figura 95, derecha). En el primer caso cabría esperar un promediado de las señales que alternan entre disposiciones *endo* y *exo*, mientras que en el segundo predominaría una disposición (*endo* o *exo*) del anillo trisustituido. El desplazamiento químico del metoxilo es intermedio entre las disposiciones *exo* y *endo*, aunque parece predominar la primera, lo que sugiere un equilibrado rápido de los conjuntos de conformaciones **F** y **H**. Esta explicación es indistinguible de la propuesta anterior de tres giros rápidos, pero permite una explicación unificada de los dioles indólicos *trans*.

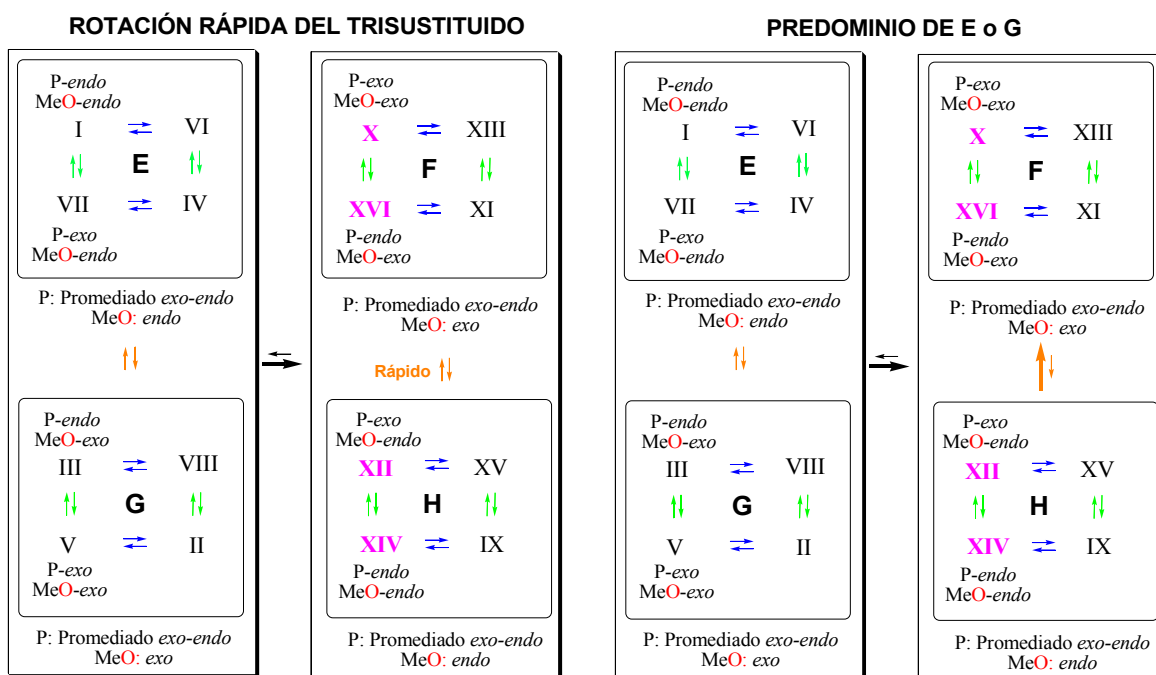


Figura 95. Posibilidades de grupos conformacionales para el diol *trans* **86**, dependiendo de si la rotación del anillo trisustituida es rápida (a la izquierda) o de si es más lenta y predomina una de las posiciones del metoxilo (a la derecha).

La acetilación de los dioles *trans* conduce a los diacetatos **91** y **93**. El segundo presenta un espectro de RMN muy similar al de su alcohol de origen, por lo que es de esperar un comportamiento similar. Por el contrario, el acetato de **86** (**91**) muestra dos juegos de señales. Esto puede explicarse por una ralentización (respecto al diol de partida) de la rotación del anillo trisustituido y del giro del puente si consideramos la hipótesis inicial de los tres giros rápidos (apareciendo las señales de los conjuntos **F** y **H** independientes). Estas explicaciones están de acuerdo con la apariencia del diol de partida, que muestra algunas señales ensanchadas.

El diol *cis* con anillo trisustituido **85** y su acetato **90** muestran espectros complejos que pueden asignarse a dos conjuntos de señales y podrían explicarse con los modelos conformacionales propuestos (rotación del indol rápida y rotación del anillo trisustituido y del puente lentas), aunque no es posible analizarlos con detalle debido al ensanchamiento de las señales en los mismos.

Esta explicación unificada de los compuestos **85-93** se muestra en la tabla 22.

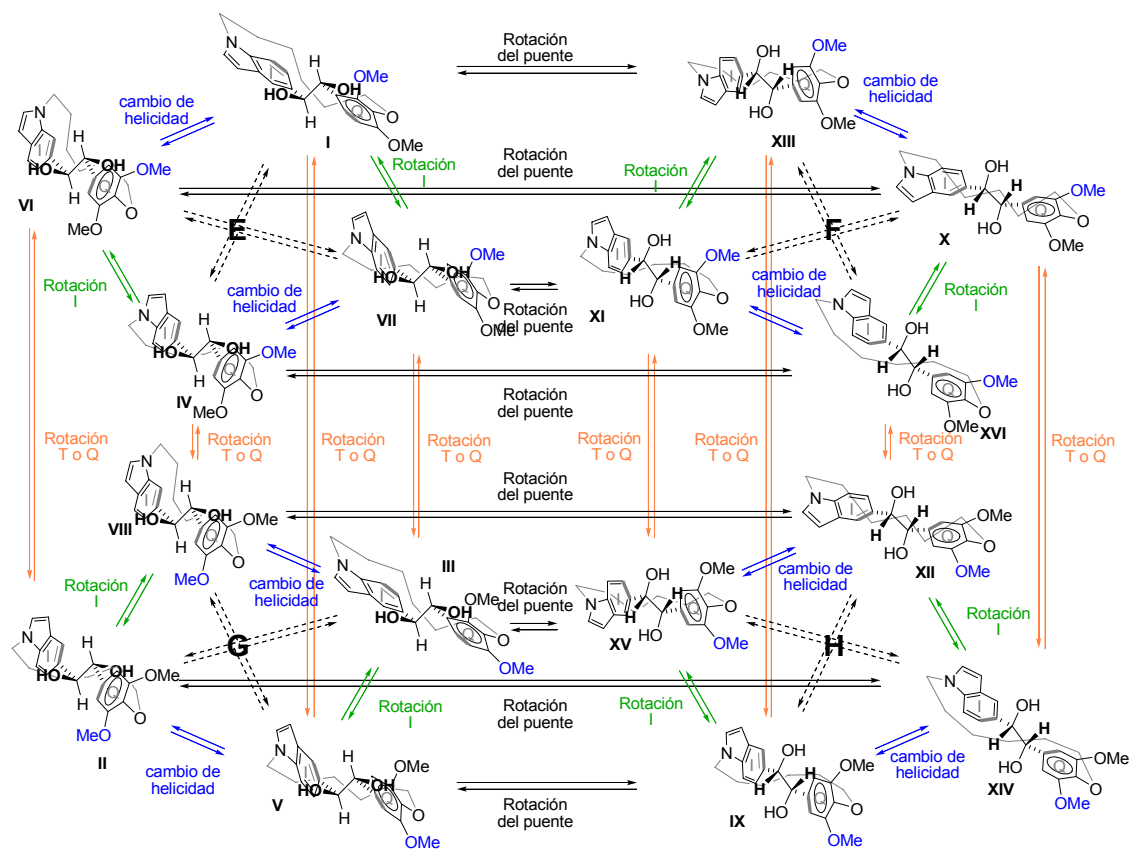


Figura 96. Equilibrios conformacionales del diol *trans* 89, en el que se aprecia la formación de los conjuntos **E**, **F**, **G** y **H** al considerar la rotación del indol y el cambio de helicidad como rápidos en la escala de tiempo de RMN y lentos la rotación del puente y del anillo tetrasustituido. Esta figura puede aplicarse de igual modo a los demás dioles y acetatos.

Comp.	Puente	Rot. I	Rot. T	Rot. Q	Rot. puente	RMN	Explicación
85	OH <i>cis</i>	+++	ℓ	-	ℓ	Complejo	E-F-G-H
90	OAc <i>cis</i>	+++	ℓ	-	ℓ	Complejo	E-F-G-H
86	OH <i>trans</i>	+++	+++ ó ℓ	-	ℓ	1 juego (QE ≠)	Promedio de F y H ó predominio de F o H
91	OAc <i>trans</i>	+++	ℓ	-	ℓ	2 juegos (QE ≠)	Conjuntos F y H.
88	OH <i>cis</i>	+++	-	No	ℓ	2 juegos (QE ≠)	Conjuntos E y F
92	OAc <i>cis</i>	+++	-	No	ℓ	2 juegos (QE ≠)	Conjuntos E y F
89	OH <i>trans</i>	+++	-	No	ℓ	1 juego (QE ≠)	Conjunto E
93	OAc <i>trans</i>	+++	-	No	ℓ	1 juego (QE ≠)	Conjunto E

Tabla 22. Resumen del análisis conformacional de los dioles y sus acetatos, donde +++ indica un giro rápido, ℓ indica giro lento y No que el giro está impedido. Las letras T, Q e I se refieren a los anillos aromáticos trisustituídos, tetrasustituídos y *N*-metilindol, respectivamente. QE ≠ significa que los átomos químicamente equivalentes presentan señales espectroscópicas diferentes.

III.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

III.5.A. Actividad inhibidora de la polimerización de tubulina.

La inhibición de polimerización de tubulina es un método “*in vitro*” para evaluar la actividad de los compuestos sintetizados. Se lleva a cabo sobre proteína microtubular (MTP) y se determina la potencia inhibitoria estableciéndose la IC₅₀ de los compuestos más potentes.

El proceso consta de tres etapas bien diferenciadas:

- Aislamiento de proteína microtubular.
- Medida de la actividad inhibitoria de los compuestos.
- Determinación de la IC₅₀.

III.5.A.1. Aislamiento de la proteína.

La proteína microtubular (MTP) fue purificada de cerebros de terneros mediante dos ciclos de polimerización/despolimerización dependientes de temperatura, de acuerdo con el método de Shelanski⁶¹ con modificaciones.

En cada ciclo se lleva a cabo una polimerización inducida por la alta temperatura (37 °C) y el GTP, que permite recoger la proteína microtubular en el precipitado resultante por centrifugación. La proteína precipitada se despolimeriza por enfriamiento a 0 °C y se vuelve a centrifugar, desechando en esta ocasión el precipitado. Tras 2 ciclos, se obtiene la MTP de una composición adecuada para llevar a cabo los ensayos de inhibición de polimerización de tubulina. En esta proteína microtubular hay una mezcla de isotipos de tubulina (70%) y MAPs (30%) (proteínas asociadas a los microtúbulos).

En el siguiente esquema se representa el proceso de aislamiento desde los cerebros hasta la proteína preparada para realizar los ensayos.

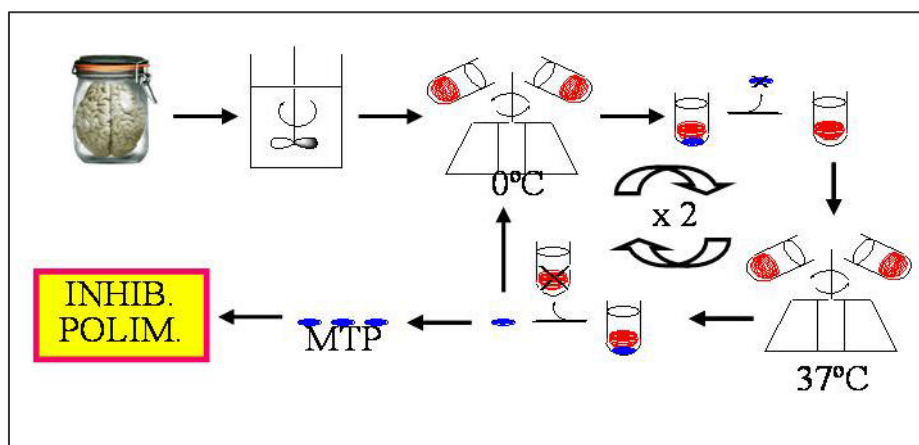


Figura 97. Proceso de aislamiento de tubulina.

⁶¹ Shelanski, M. L.; Gaskin, F.; Cantor, C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1973**, 70, 765-768.

III.5.A.2. Ensayos de la actividad inhibitoria de polimerización de tubulina de los compuestos.

El ensamblaje *in vitro* de tubulina se monitoriza a través de la medida a 450 nm (en lugar de 350 nm para evitar la absorción por los ligandos) de la turbidez generada por la formación de microtúbulos.⁶² Cada ensayo incluye siempre un control, sin ligando. Las muestras contienen 1,0 mg/mL de MTP y el ligando a una concentración 20 μ M en el caso de que sólo haya un compuesto.

Todos los compuestos utilizados están disueltos en DMSO para evitar problemas de solubilidad. La concentración máxima de DMSO en los experimentos es del 4%, concentración que no afecta a la polimerización de la tubulina.⁶³

Los ensayos se realizan a una concentración relativamente alta (20 μ M) con el fin de seleccionar los compuestos que presentan una IC₅₀ igual o inferior a esta concentración. La determinación de la IC₅₀ se desarrolla en el siguiente apartado.

El grado de inhibición de la polimerización presentada por los ligandos se establece por comparación de la amplitud de la curva de polimerización de cada muestra con ligando con la de la muestra control, considerada como el 100% de polimerización. La relación entre ambas amplitudes (%) es la capacidad de polimerización de la preparación de tubulina en presencia de ese ligando.

De esta manera, se realizó un primer screening de todos los compuestos sintetizados y se seleccionaron para medir las IC₅₀ aquellos cuya inhibición era superior al 50%. En la tabla siguiente se recogen los resultados de los compuestos que no fueron seleccionados:

⁶² Gaskin, F.; Cantor, C. R.; Shelanski, M. L. Turbidimetric Studies of the *in Vitro* Assembly and Disassembly of Porcine Neurotubules. *J. Mol. Biol.* **1974**, *89*, 737-758.

⁶³ Dumortier, C.; Gorbunoff, M.; Andreu, J. M.; Engelborghs, Y. Different kinetic pathways of the binding of two biphenyl analogues of colchicine to tubulin. *Biochemistry* **1996**, *35*, 4387-4395.

COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)	COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)
19	20	12	70	20	22
22	20	20	71	20	37
26	20	0	72	20	37
27	20	5	73	20	0
34	20	7	74	20	0
35	20	16	79E y 80E	20	49
38	20	12	84	20	19
39	20	32	85	40	0
51	20	32	86	40	0
56	20	12	87	20	44
57	20	9	88	40	0
62	20	32	89	40	0
66	20	40	90	40	18
67	20	-	91	40	0
68	20	0	92	40	0
69	20	2	93	40	0

Tabla 23. Compuestos no seleccionados para medir su IC₅₀.

Los compuestos seleccionados para calcular la IC₅₀, se muestran en la tabla siguiente:

COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)	COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)
20	20	52	52	20	90
23	5	81	53	20	93
24	20	61	54	5	93
25	20	86	55	20	96
30	20	94	59	20	97
32	20	86	60	20	98
43	20	86	61	20	98
44	20	68	63	20	87
45	20	98	64	20	95
46	20	61	65	5	89
47	20	96	75	20	95
48	5	85	77	20	98
49	20	100	78	20	91
50Z	20	96	79Z y 80Z	20	93
50	20	88			

Tabla 24. Compuestos con inhibición mayor del 50%.

III.5.A.3. Determinación de la IC₅₀ de los compuestos seleccionados.

Una vez seleccionados los compuestos, se ensayan a diferentes concentraciones (generalmente 0,5, 1, 2, 5, 7 y 10 μ M) con el fin de calcular su IC₅₀, definida como la concentración de compuesto que causa el 50% de la inhibición de polimerización. La determinación se realiza después de 20 minutos de incubación de las muestras (ligando +MTP). La IC₅₀ para los diferentes ligandos inhibidores de polimerización de tubulina se establece ajustando a una ecuación monoexponencial el porcentaje de polimerización encontrado en función de la concentración de ligando.⁶⁴ En la siguiente tabla se recogen los valores de IC₅₀ calculados para los compuestos seleccionados:

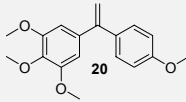
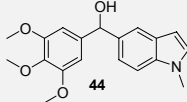
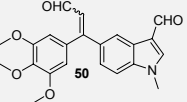
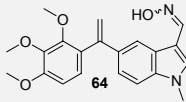
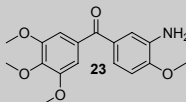
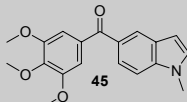
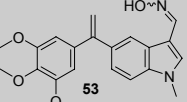
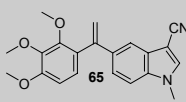
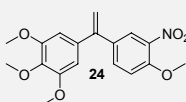
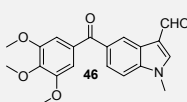
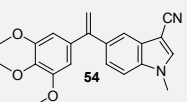
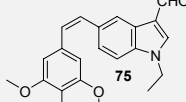
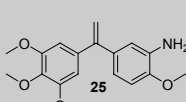
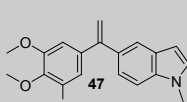
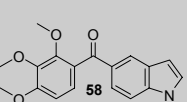
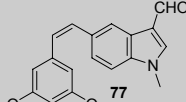
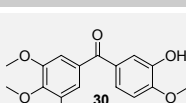
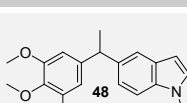
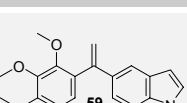
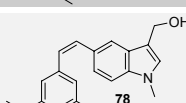
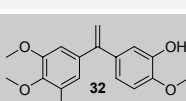
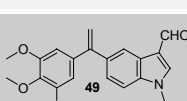
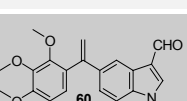
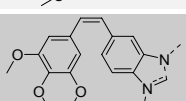
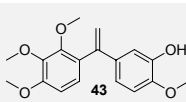
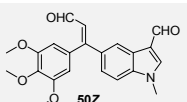
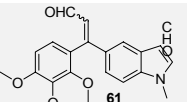
LIGANDO	IC ₅₀	LIGANDO	IC ₅₀	LIGANDO	IC ₅₀	LIGANDO	IC ₅₀
	25,7		18		≈7		4,0
	1,5		7,9		2,6		<u>2,2</u>
	12,2		16,9		1,2		1,2
	<u>2,2</u>		0,7		0,4		0,5
	2,5		1,0		4,7		1,2
	0,8		0,9		4,0		<u>2,2</u>
	12,7		3,4		5,9		

Tabla 25. IC₅₀ de los compuestos seleccionados. En cursiva las IC₅₀ de la fenstatina y la aminofenstatina. Se ha subrayado la IC₅₀ de los compuestos más potentes que la fenstatina (aunque menos que la aminofenstatina) y en negrita se han señalado las IC₅₀ que están por debajo de la presentada por la aminofenstatina.

⁶⁴ Origin[®] 6.0: <http://www.originlab.com/>

III.5.B. Citotoxicidad.

La toxicidad frente a líneas de células cancerosas representativas de los compuestos sintetizados en este trabajo ha sido evaluada por el Dr. Mollinedo (Instituto del Cáncer de Salamanca). Los compuestos se han ensayado frente a distintas líneas celulares para determinar la citotoxicidad.⁶⁵ Con este fin se han utilizado los siguientes tipos de células.

- HL-60: Leucemia mieloide humana.
- A-549: Cáncer de pulmón humano.
- HeLa: Carcinoma cervical humano.
- HT-29: Carcinoma de colon humano.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla siguiente y expresan la concentración que produce un 50% de inhibición de la proliferación celular (IC₅₀).

Compuesto	HL-60 (10 ⁻⁶ M)	A-549 (10 ⁻⁶ M)	HeLa (10 ⁻⁶ M)	HT-29 (10 ⁻⁶ M)
19	0,27	3,10	0,037	<u>0,29</u>
20	0,30	2,00	0,29	<u>0,31</u>
22	1,80	>10	2,50	2,90
23	0,03	0,057	0,03	0,032
24	0,032	0,026	0,30	<u>0,06</u>
25	0,029	0,031	0,0032	0,041
26	0,31	2,30	0,27	<u>0,36</u>
27	0,27	0,52	0,034	<u>0,25</u>
30	0,031	0,29	0,03	1,80
32	0,0028	0,028	0,0029	<u>0,44</u>
34	2,00	>10	1,80	3,10
35	0,48	>10	0,30	3,20
38	2,60	>10	0,032	2,90

⁶⁵ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

Compuesto	HL-60 (10 ⁻⁶ M)	A-549 (10 ⁻⁶ M)	HeLa (10 ⁻⁶ M)	HT-29 (10 ⁻⁶ M)
39	0,23	2,70	0,06	<u>0,33</u>
43	0,24	<u>0,27</u>	0,035	<u>0,31</u>
45	0,027	<u>0,19</u>	0,025	0,027
46	0,31	>10	0,32	3,00
47	0,0028	0,028	0,0027	0,0031
48	0,032	0,053	0,012	0,028
49	0,028	3,00	0,0032	<u>0,28</u>
50	0,029	0,32	0,03	<u>0,17</u>
50Z	0,033	0,34	0,031	<u>0,22</u>
51	0,25	3,20	0,31	2,00
52	0,28	0,32	0,31	0,31
54	0,0056	0,029	0,0032	0,0037
56	0,18	3,2	0,038	<u>0,30</u>
58	0,24	0,38	0,03	<u>0,24</u>
59	0,28	0,73	0,032	<u>0,31</u>
60	0,032	1,80	0,032	<u>0,29</u>
61	0,32	0,35	0,30	<u>0,34</u>
62	0,22	0,44	0,30	<u>0,32</u>
63	0,37	0,47	0,31	2,40
64	0,27	<u>0,29</u>	0,034	<u>0,32</u>
65	0,027	0,36	0,032	0,032
66	0,29	2,00	0,27	0,31
67	0,30	2,30	0,3	0,31
68	1,80	>10	0,43	3,20
75	0,03	>10	0,029	3,10
77	0,0031	2,70	0,0032	<u>0,28</u>
78	0,028	0,045	0,032	<u>0,033</u>
79Z y 80Z	0,032	0,034	0,031	0,032

Tabla 26. IC₅₀ de los compuestos ensayados frente a cada una de las líneas celulares. Al igual que en la tabla anterior se han marcado en negrita los valores de los compuestos que presentan mayor potencia que la fenstatina y la amino fenstatina (en cursiva) y se han subrayado los que son más potentes que la fenstatina aunque menos que la aminofenstatina.

III.5.C. Discusión de los resultados de actividad.

III.5.C.1. Aspectos generales.

Los resultados de inhibición de polimerización de tubulina y los de citotoxicidad frente a distintas líneas celulares muestran que los análogos macrocíclicos de combretastatinas son inactivos o presentan una potencia muy reducida.⁶⁶ Por el contrario, los resultados obtenidos para los análogos no macrocíclicos muestran que, como conjunto, los compuestos sintetizados en este trabajo constituyen una familia con gran capacidad para inhibir la proliferación celular, probablemente a través de la inhibición de la polimerización de la tubulina.

La comparación de la actividad de los compuestos sintetizados previamente en el grupo de investigación⁶⁷ con la de los compuestos obtenidos en este trabajo, sugiere que estos últimos poseen una combinación de elementos estructurales que confieren alta potencia inhibitoria de la polimerización de tubulina. Así, en numerosos compuestos de esta familia, la presencia conjunta de un anillo de trimetoxifenilo y de un resto *N*-metil-5-indolilo, conectados por distintos puentes que sitúan los anillos en planos diferentes, parece ser un esqueleto muy favorable, como se deduce de la alta potencia observada.

⁶⁶ a) Mateo, C.; Álvarez, R.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Conformationally restricted macrocyclic analogues of combretastatins *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 6316-6320. b) Mateo, C.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Stilbenophane Analogues of Deoxycombretastatin A-4. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6544 – 6547.

⁶⁷ a) Sánchez Maya, A. B. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, **2004**. b) Mateo, C. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, **2006**. c) Álvarez, C. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, **2006**. d) López, V. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, **2007**. d) Mateo, C.; López, V.; Medarde, M.; Peláez, R. Synthesis and conformational analysis of macrocyclic hydroxystilbenes linked between the *para-para* positions. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7246-7256.

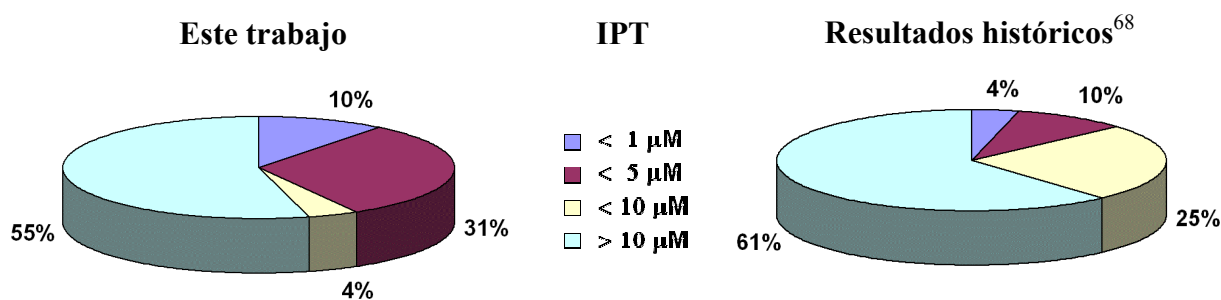


Figura 98. Clasificación de los compuestos obtenidos en este trabajo (a la izquierda) y de los compuestos obtenidos por el grupo de investigación anteriormente (a la derecha) en función de la IPT que presentan: menor de 1 μM en morado, entre 1 y 5 μM en granate, entre 5 y 10 μM en amarillo y por encima de 10 μM en verde.

La correlación de los resultados de citotoxicidad con los resultados de inhibición de polimerización de tubulina es, en general, buena. Esta correlación es mejor para valores de citotoxicidad promedio y máximos, dominados por los valores correspondientes a líneas celulares sensibles, en los que el efecto del compuesto depende principalmente de la potencia de éste. Sin embargo, la correlación disminuye en los valores mínimos de citotoxicidad, que se corresponden con los de líneas celulares más resistentes. Esta disminución puede ser debida a que el efecto citotóxico esté influenciado, además de por la potencia del compuesto, por otros mecanismos de resistencia celulares. De cualquier modo, la tendencia observada en los tres casos en la figura 99 sugiere que la interferencia con la polimerización de la tubulina es el mecanismo por el que estos compuestos ejercen su actividad frente a los cultivos celulares. En investigaciones anteriores se ha observado que, compuestos relacionados con los descritos en este trabajo, y a las dosis en que ejercen su acción sobre las células, producen efectos observables sobre el sistema microtubular, lo cual apoya dicha hipótesis.⁶⁹

⁶⁸ Sólo se han evaluado los valores de IPT de aquellos compuestos que presentaban citotoxicidades inferiores a 1 μM .

⁶⁹ Maya, A. B.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 556–568.

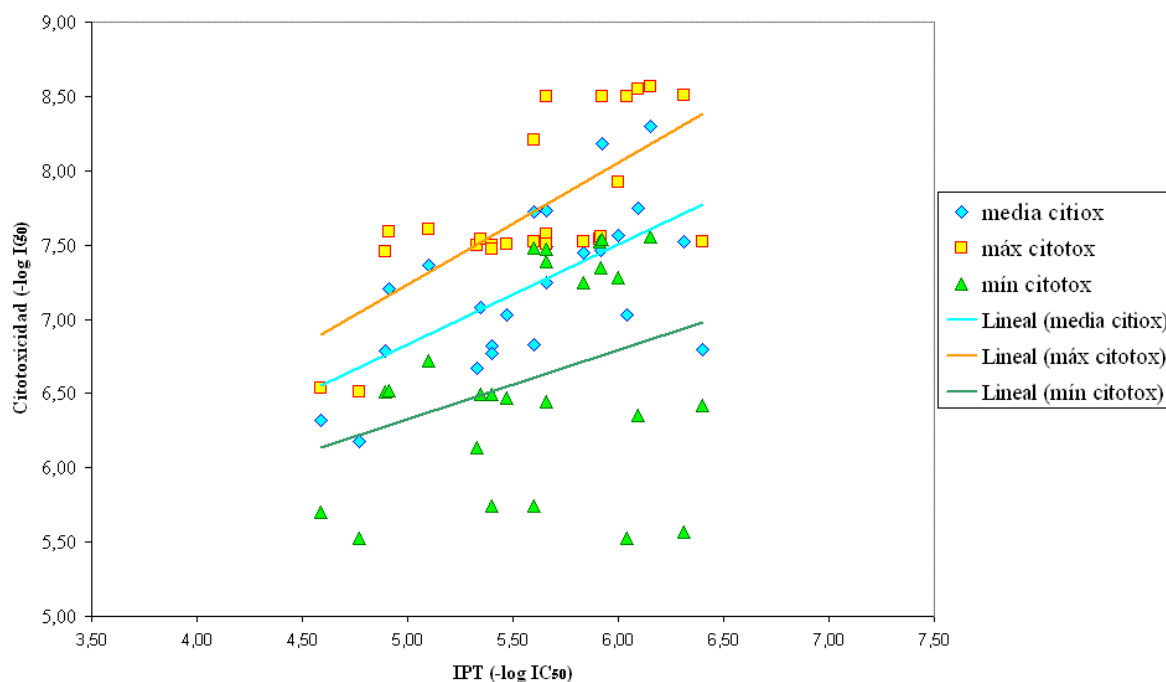


Figura 99. Correlación de las IC_{50} de inhibición de polimerización de tubulina con las IC_{50} promedio (azul claro), máximos (naranja) y mínimos (verde) de citotoxicidad frente a las cuatro líneas celulares.

El ensayo de la actividad inhibitoria de la polimerización de tubulina de los compuestos a una única concentración elevada permite discriminar los compuestos más potentes de los menos, lo cual permite una rápida detección de combinaciones poco favorables. La detección precoz de zonas del espacio químico más desfavorecidas (como en nuestro caso las combretastatinas macrocíclicas) permite ahorrar esfuerzos sintéticos y concentrarlos en zonas más favorables.

Las IC_{50} confirman las tendencias observadas en los ensayos iniciales, pero su determinación es importante para matizar las relaciones estructura-actividad y facilitar el diseño de nuevos compuestos. En la mayoría de los casos, los valores de inhibición de polimerización de tubulina obtenidos para un mismo compuesto a distintas concentraciones se ajustan bien a comportamientos monoexponenciales (figura 100), de acuerdo con lo esperado.⁶³ Los valores de IC_{50} obtenidos en este trabajo se encuentran entre los más potentes descritos para inhibidores de la polimerización de tubulina.

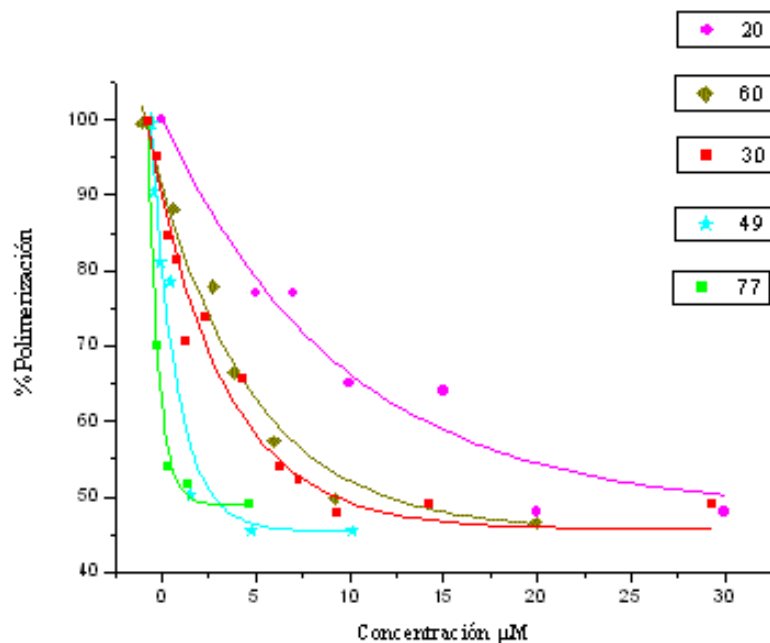


Figura 100. Representación gráfica de la polimerización de tubulina a diferentes concentraciones, a partir de la cual se ha calculado la IC_{50} en IPT, para cinco de los compuestos sintetizados en este trabajo.

La comparación de las potencias citotóxicas frente a las diferentes líneas celulares (representadas frente a la inhibición de polimerización de tubulina en la figura 101) muestra que HeLa (línea rosa) y HL-60 (línea naranja) son más sensibles, mientras que A-549 (línea azul) y HT-29 (línea verde) son más resistentes. Las líneas convergen hacia la izquierda ya que los compuestos poco potentes frente a la polimerización de tubulina son poco citotóxicos. El origen de estas diferencias puede deberse a una sensibilidad diferente de la tubulina en cada línea celular (atribuible a la expresión de distintos isotipos) o a factores ajenos a la tubulina (captación, eliminación...).

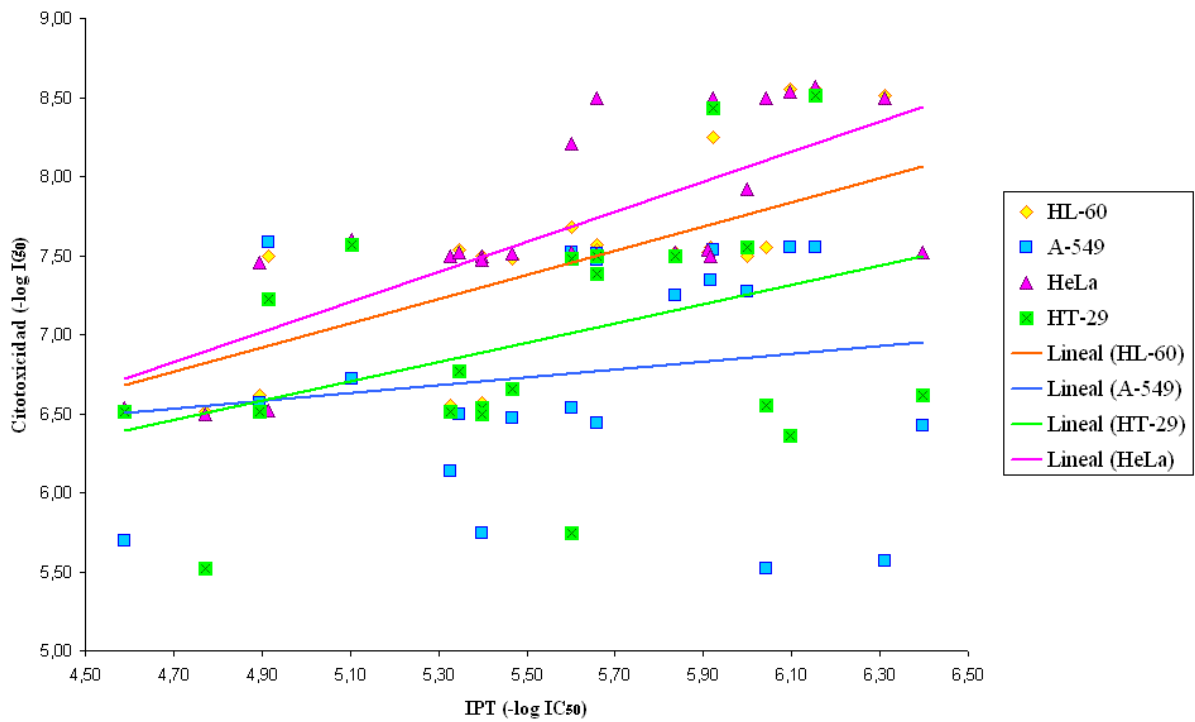


Figura 101. Representación de los valores de cada línea celular frente a los valores de inhibición de polimerización de tubulina. HeLa (en rosa), HL-60 (en naranja), A-549 (en azul) y HT-29 (en verde).

III.5.C.2. Consideraciones estructurales generales.

A lo largo de este trabajo se han sintetizado compuestos que pueden ser clasificados estructuralmente en diversas categorías, dependiendo de los elementos estructurales que incorporan. La comparación de conjuntos de compuestos que sólo difieren por parejas en un elemento estructural permite, al menos de forma cualitativa, establecer qué elementos son más o menos favorables. En nuestro caso, hemos comparado compuestos que difieren en el anillo de trimetoxifenilo (2,3,4- frente a 3,4,5-), en la naturaleza del segundo anillo (indoles frente a fenilos sustituidos) o en el puente entre los anillos (combretastatinas frente a fenstatinas frente a isocombretastatinas). Además, es posible comparar la potencia de cada uno de los grupos en los diferentes ensayos.

Para comparar los grupos que se diferencian en el anillo de trimetoxifenilo se han representado los valores de uno frente a los del otro para cada pareja. Si ambos elementos estructurales conducen a compuestos equipotentes, los puntos se sitúan en la diagonal. Si un elemento estructural confiere una mayor potencia, los puntos se concentran en la mitad del gráfico delimitada por el eje correspondiente a dicho elemento estructural. Así, en la figura 102, los puntos se concentran en la mitad inferior del gráfico, indicando una preferencia por el anillo 3,4,5-trimetoxifenilo frente al 2,3,4-trimetoxifenilo, tanto para la inhibición de polimerización de tubulina (puntos marrones) como para las cuatro líneas celulares HL-60 (rombos naranjas), A-549 (cuadrados azules), HeLa (triángulos rosas) y HT-29 (cuadrados verdes).

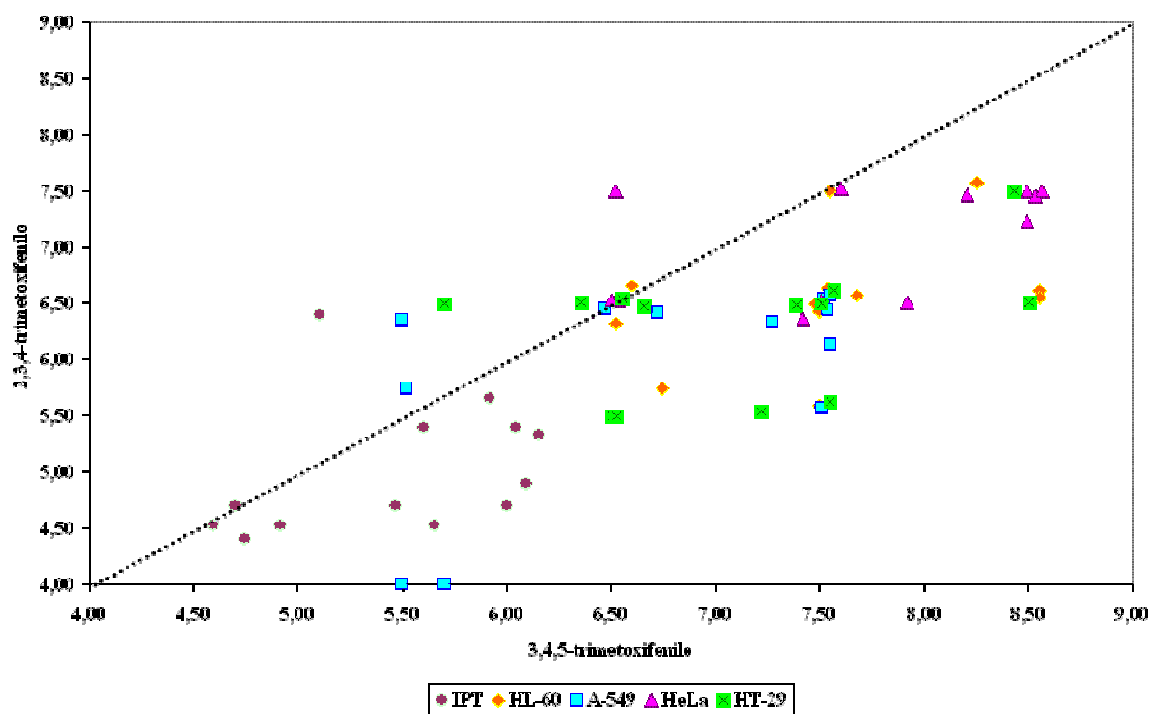


Figura 102. Representación de los valores de citotoxicidad e inhibición de polimerización de tubulina por parejas de valores que sólo difieren en la disposición del trimetoxifenilo. IPT (en marrón), HeLa (en rosa), HL-60 (en naranja), A-549 (en azul) y HT-29 (en verde). Los valores representados corresponden al $-\log$ de las IC_{50} .

La representación gráfica (figura 103) de la citotoxicidad promedio frente a la IPT en compuestos con el resto 2,3,4-trimetoxifenilo, combinado bien con indoles (puntos rosas) o con fenilos sustituidos (rombos azules), muestra una gran diferencia entre ambos tipos estructurales: los derivados bencénicos (en verde) son muy poco activos, mientras que los derivados indólicos presentan potencias elevadas, tal y como se observa en los diagramas de barras para la IPT (arriba a la izquierda) y para la citotoxicidad promedio (abajo a la derecha). En este caso no parecen cumplirse las reglas habituales que permiten clasificar combretastatinas, fenstatinas e isocombretastatinas en activos o inactivos en función de los anillos aromáticos.⁷⁰ Una posible explicación es que el resto 2,3,4-trimetoxifenilo fuerce al resto de la molécula a adoptar una disposición algo diferente, lo que permite discriminar entre ambos tipos estructurales (fenilos e indoles) al cambiar el entorno donde se localizan.

⁷⁰ a) Gaukroger, K.; Had.eld, J. A.; Lawrence, N. J.; Nolan S.; McGown, A. T. Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3033–3037. b) Nam, N. H. Combretastatin A-4 analogues as antimetabolic antitumor agents. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1697-1722. c) Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044.

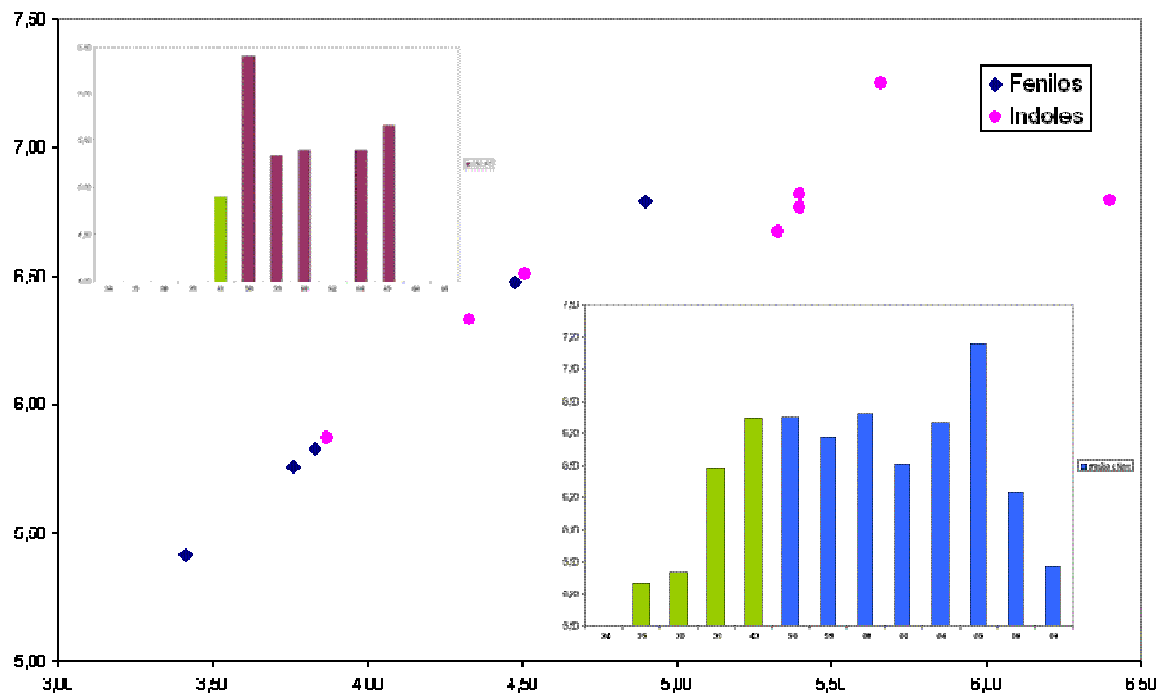


Figura 103. Representación gráfica de los $-\log IC_{50}$ de citotoxicidad media frente a los de IPT de los compuestos con 2,3,4-trimetoxifenilo, diferenciando entre los que el otro anillo aromático está formado por otro resto fenilo (rombos azules) de los que poseen un indol (puntos rosas). También se muestran los diagramas de barras en los que se representa la IPT ($IC_{50} \mu M$) para cada compuesto representado en la gráfica de puntos (arriba a la izquierda) y la citotoxicidad media ($IC_{50} \mu M$) para los mismos compuestos (abajo a la derecha). En ambos diagramas las barras verdes se corresponden con los compuestos que no poseen grupo indol.

La comparación entre los compuestos que difieren en el anillo B (resto fenilo o resto indolilo) también se ha realizado mediante la representación de los valores de citotoxicidad media frente a los de inhibición de polimerización de tubulina para cada uno de los grupos. La figura 104 muestra que ambos grupos son muy similares, de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos anteriores, que sugerían que el resto *N*-metil-5-indolilo es un buen reemplazo del grupo 4-metoxi-3-hidroxifenilo presente en la combretastatina A-4 y la fenstatina, que son los más representativos entre los inhibidores más potentes de polimerización de tubulina que se unen al sitio de la colchicina.^{69,71}

⁷¹ Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; López, J. L.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Diarylmethoxime and hydrazone derivatives with 5-indolyl moieties as potent inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5952-5961.

Además, se observa una mayor dispersión de los datos correspondientes al indol. Parte de esta dispersión puede ser debida al mayor número de compuestos representados. Sin embargo, son interesantes los compuestos que se desvían de la tendencia general en las regiones de alta potencia. Estos compuestos, que presentan citotoxicidades (elipsoide verde) o inhibiciones de la polimerización de tubulina (elipsoide azul) por encima de los demás, se discutirán más adelante cuando se haga referencia a patrones de sustitución concretos.

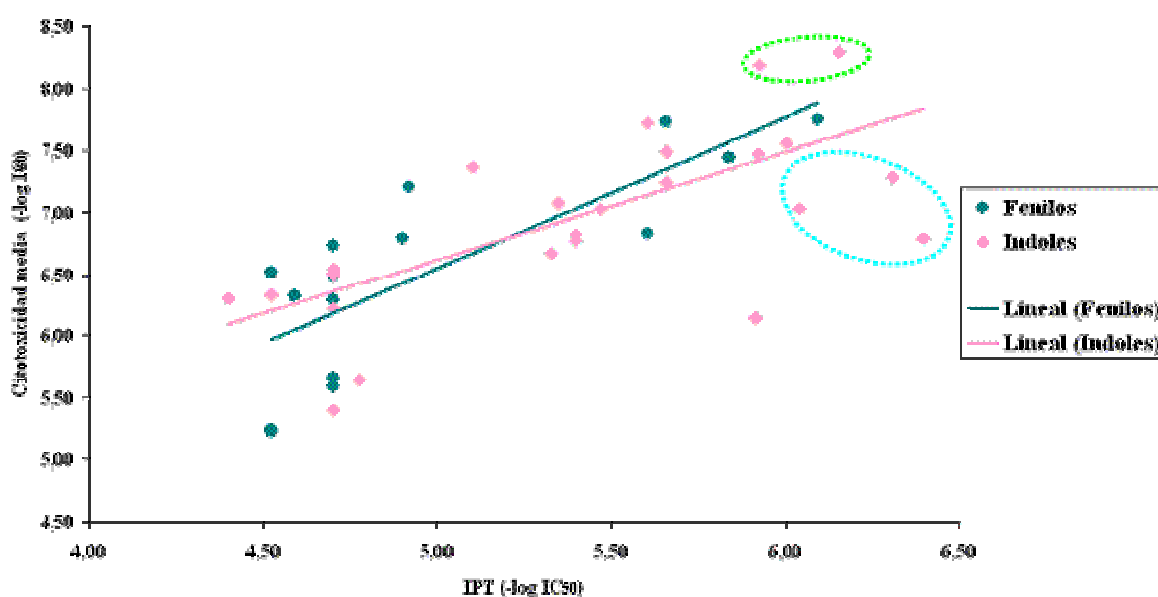


Figura 104. Representación de los valores de citotoxicidad frente a los de inhibición de polimerización de tubulina en la que se diferencian los compuestos en los que el anillo B es un resto fenilo (puntos azules) o un resto indolilo (rombos rosas).

La representación de los valores de citotoxicidad medios, frente a los valores de inhibición de polimerización de tubulina, también es útil para establecer comparaciones entre compuestos con diferente puente entre los anillos aromáticos (figura 105). Las isocombretastatinas son más citotóxicas que las fenstatinas a similar potencia inhibidora de la polimerización de tubulina. Las combretastatinas presentan una mayor variabilidad, como muestran los compuestos cuya toxicidad no correlaciona con la IPT (marcados por círculos naranjas). Si se excluyen estos compuestos, se observa que las combretastatinas presentan una mayor potencia citotóxica que fenstatinas con similar IPT.

Sin embargo, las combretastatinas y las isocombretastatinas presentan relaciones citotoxicidad – IPT comparables. Los compuestos hidrogenados presentan bajas potencias, salvo el derivado indólico señalado con una flecha en la gráfica. Otros análogos con hibridación sp^3 en el puente son también menos potentes, como ocurre con los alcoholes, de acuerdo con lo descrito anteriormente.^{69,71,72}

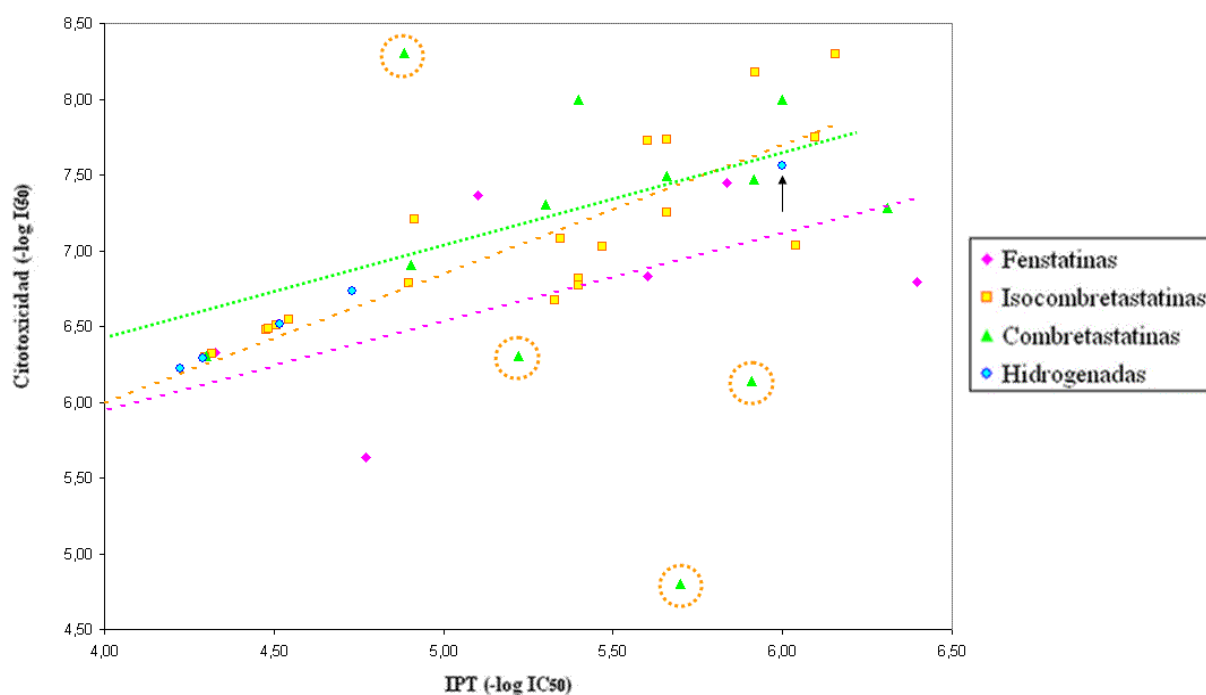


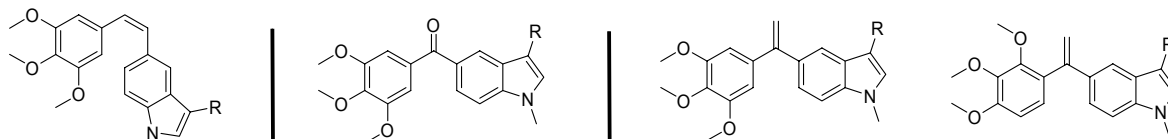
Figura 105. Representación de los valores de citotoxicidad frente a los de inhibición de polimerización de tubulina en la que se diferencian los compuestos por el tipo de puente entre los anillos aromáticos: fenstatinas (rombos rosas), isocombretastatinas (cuadrados amarillos), combretastatinas (triángulos verdes) y derivados hidrogenados (puntos azules).

⁷² a) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Synthesis and biological activity of naphthalene analogues of phenstatins: naphthylphenstatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3417-3420. b) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Naphthylphenstatins as tubulin ligands: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8999-9008.

III.5.C.3. Análisis de la contribución de elementos estructurales individuales.

Para el diseño de nuevos compuestos es interesante disponer de reglas sencillas que permitan valorar cualitativamente la importancia o la contribución a la actividad de distintos sustituyentes. Así, en combretastatinas el anillo de trimetoxifenilo es considerado esencial, el metoxilo en *para* del otro anillo es importante y el sustituyente en *orto* de éste es reemplazable e incluso prescindible. Estas reglas resumen la estructura de la mayor parte de las combretastatinas con potencias interesantes descritas en bibliografía.⁷⁰ La comparación de parejas de estructuras con o sin determinados sustituyentes permite valorar la importancia de dichos sustituyentes. Además, la consideración de varios sustituyentes en una misma posición puede servir para establecer reglas de carácter más general (sustituyentes voluminosos no son tolerados, dadores de enlace de hidrógeno son buenos, etc...). Con este fin, se han llevado a cabo comparaciones de sustituyentes (o reemplazos de átomos) en la posición tres del anillo de indol, tanto en fenstatinas como en combretastatinas o en isocombretastatinas.

Los primeros compuestos sintetizados con modificaciones en la posición 3 del indol fueron los aldehídos (figura 106). La comparación de sus resultados de actividad con los de los compuestos no sustituidos revela que la introducción del grupo formilo es muy favorable en combretastatinas, menos en isocombretastatinas y desfavorable en las fenstatinas.



	H	CHO		H	CHO		H	CHO		H	CHO				
	IPT	2	0,5		IPT	7,9	17		IPT	0,7	0,9		IPT	4,7	4
	HL-60	-	0,003		HL-60	0,03	0,3		HL-60	0,003	0,03		HL-60	0,3	0,03
	A-549	16	2,7		A-549	0,2	>10		A-549	0,03	3		A-549	0,7	1,8
	HeLa	-	0,003		HeLa	0,025	0,3		HeLa	0,003	0,003		HeLa	0,03	0,03
	HT-29	-	0,3		HT-29	0,03	3		HT-29	0,003	0,3		HT-29	0,3	0,3

Figura 106. Comparación de las IC₅₀ (μM) de los derivados con grupo formilo en posición tres del indol en combretastatinas (izquierda),⁶⁹ fenstatinas⁷¹ (centro) e isocombretastatinas (derecha). Los valores que implican una clara mejora están resaltados en negrita.

La reducción del grupo aldehído a hidroximetilo (figura 107) conduce, en general, a compuestos menos potentes. En las combretastatinas el derivado hidroximetílico es más potente que el compuesto no sustituido. Además, las dos líneas celulares habitualmente más resistentes (A-549 y HT-29) parecen ser más sensibles a estos compuestos con un grupo alcohólico, superando incluso al derivado formilado.

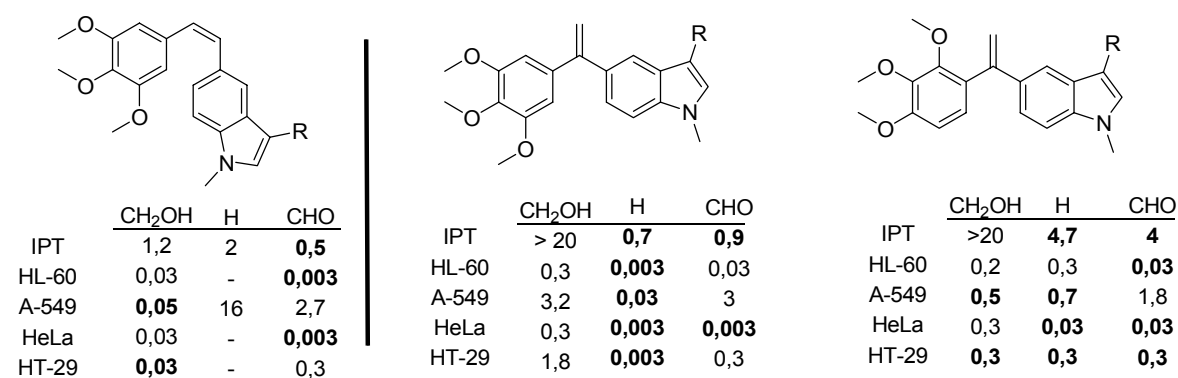


Figura 107. Comparación de las IC₅₀ (µM) de los derivados con grupo hidroximetilo en posición tres del indol en combretastatinas (izquierda) e isocombretastatinas (derecha). Los valores que implican una clara mejora están resaltados en negrita.

A partir del derivado formilado se introdujeron diferentes modificaciones en la posición tres del indol de las isocombretastatinas. Estas modificaciones incluían variaciones en el tamaño, la geometría, el patrón de dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno. Así, se prepararon las oximas y sus acetatos, las hidrazonas y los nitrilos a partir de los acetatos de oxima. En la siguiente gráfica (figura 108) puede compararse el efecto en la actividad de dichas modificaciones.

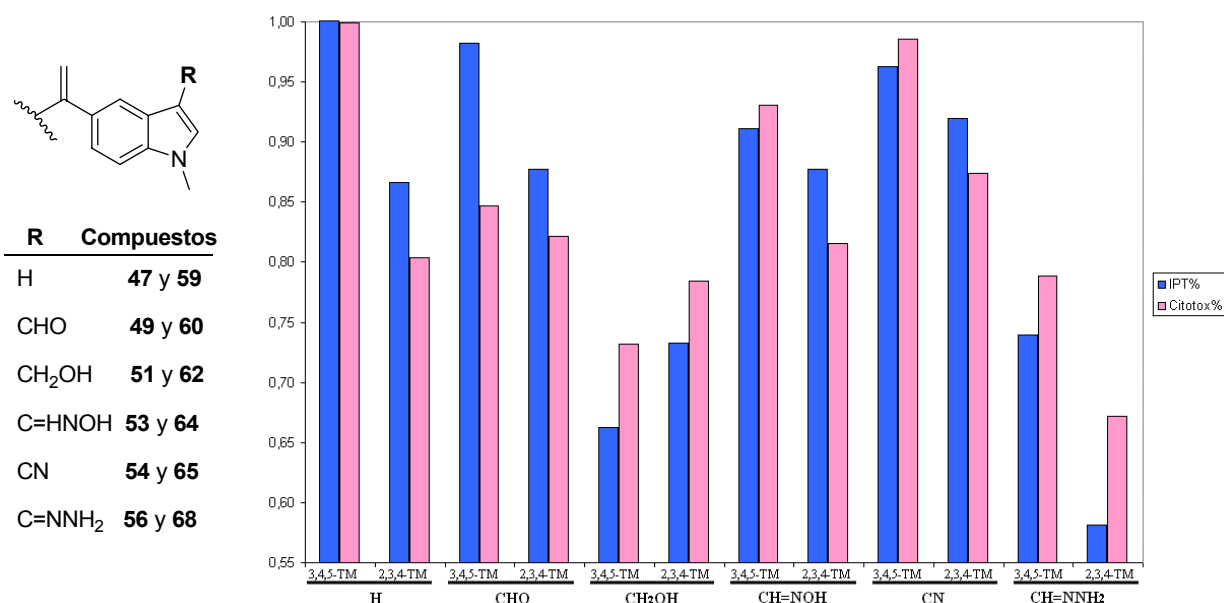


Figura 108. Representación de la potencia en IPT (azul) y citotoxicidad (rosa) de los compuestos con diferentes sustituyentes en la posición tres del indol respecto al compuesto de referencia (45).

De la figura 108 se deduce que ninguna de las sustituciones mejora la potencia presentada por la isocombretastatina con el indol sin sustituir, tanto en IPT como en citotoxicidad. La sustitución más favorable de las ensayadas es el grupo nitrilo, que presenta una actividad comparable con la del modelo. A diferencia de otros sustituyentes, la combinación del nitrilo con un resto 2,3,4-trimetoxifenilo no es muy desfavorable. Estos resultados sugieren que el volumen del sustituyente es un factor importante en la actividad. De acuerdo con esta afirmación, intentos de llevar a cabo experimentos de docking de estos ligandos sobre el complejo de tubulina con colchicina o podofilotoxina produjeron, en todos los casos, complejos en los que el ligando se encontraba desplazado fuera del sitio de la colchicina o rotado respecto a la disposición que adopta el ligando sin sustituyentes.⁷³ Las oximas mostraron valores próximos a los de los nitrilos, tanto en citotoxicidad como en IPT, mientras que las hidrazonas resultaron ser mucho menos potentes.

⁷³ a) Peláez, R.; Therón, R.; García, C. A.; López, J. L.; Medarde, M. Design of New Chemoinformatic Tools for the Analysis of Virtual Screening Studies: Application to Tubulin Inhibitors *Adv. Soft. Comp.* **2009** 49, 189. b) Peláez, R.; Therón, R.; García, C. A.; López, J. L.; Medarde, M. Application of Chemoinformatic Tools for the Analysis of Virtual Screening Studies of Tubulin Inhibitors. *Adv. Soft. Comp.* **2007** 44, 411.

Para analizar en mayor detalle los efectos de las sustituciones más potentes (oximas y nitrilos) sobre cada línea celular ensayada, se han representado sus potencias respecto a la de los compuestos sin sustituir (figura 109). De acuerdo con lo expuesto en la discusión de los aspectos estructurales generales, los compuestos con 3,4,5-trimetoxifenilo son más potentes, presentando una citotoxicidad cercana a la del compuesto más potente en IPT, con el indol sin sustituir. Además, se observa una disminución de la citotoxicidad en relación a la IPT para HL-60 y HT-29. Por el contrario HeLa y A-549, que es una de las líneas habitualmente más resistentes, mantienen la sensibilidad en proporción a la potencia inhibidora de la polimerización de tubulina. Esta selectividad, que puede ser una característica interesante de los compuestos con anillo 2,3,4-trimetoxifenilo, no se observa en el análogo con un grupo nitrilo. Los compuestos con anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo presentan una notable actividad frente a A-549 y, en particular, la oxima muestra una gran citotoxicidad frente a esta línea celular en relación a su actividad inhibidora de polimerización de tubulina.

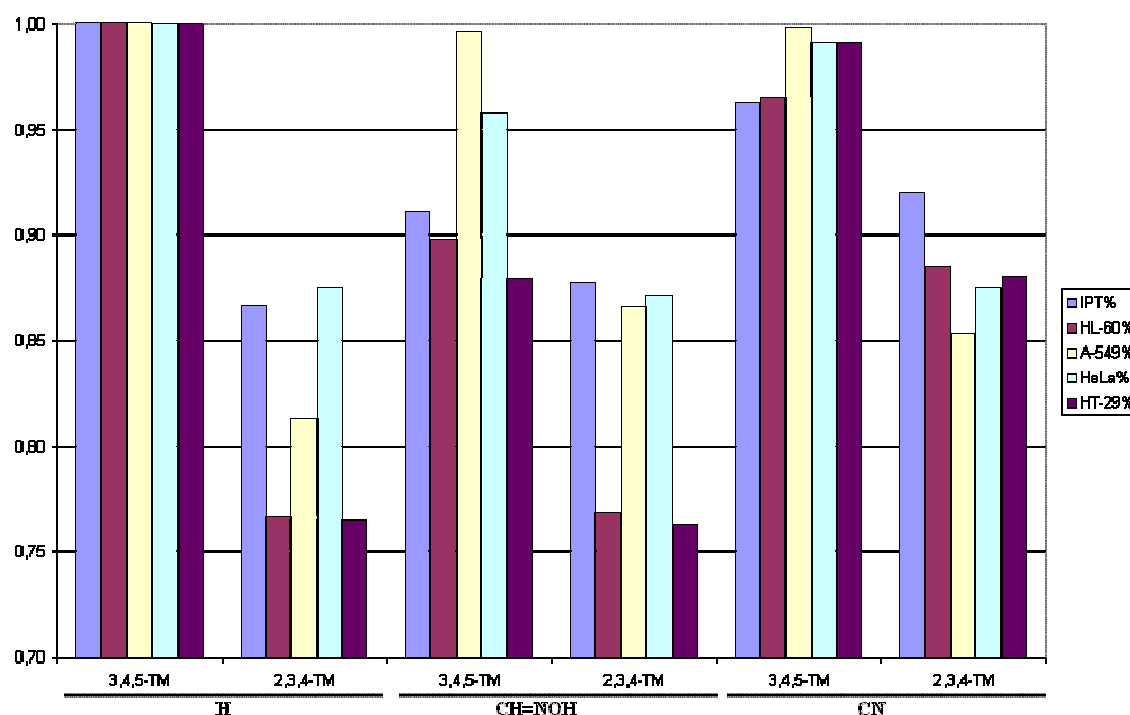


Figura 109. Representación de la potencia en IPT (azul) y citotoxicidad frente a las diferentes líneas celulares de los compuestos con grupos oxima y nitrilo respecto al compuesto de referencia (que posee el anillo indólico sin sustituir, 45).

Durante la síntesis de los derivados aldehídicos, se han obtenido las formil isocombretastatinas que incluyen un grupo formilo adicional en el puente (figura 110). Estos derivados, análogos estructurales de los alquenilidendiariimetanos (ADAMs) y CC-5079,⁷⁴ han resultado ser menos potentes que las isocombretastatinas con un solo formilo sobre el anillo indólico. En general, parece que la combinación de un puente apolar (olefina) con un sustituyente polar (CHO, CN, C=NOH) en la posición 3 del indol es favorable, mientras que la combinación de dos elementos polares está menos favorecida (C=O, C=CH-CHO en el puente con CHO, CN en tres del indol).

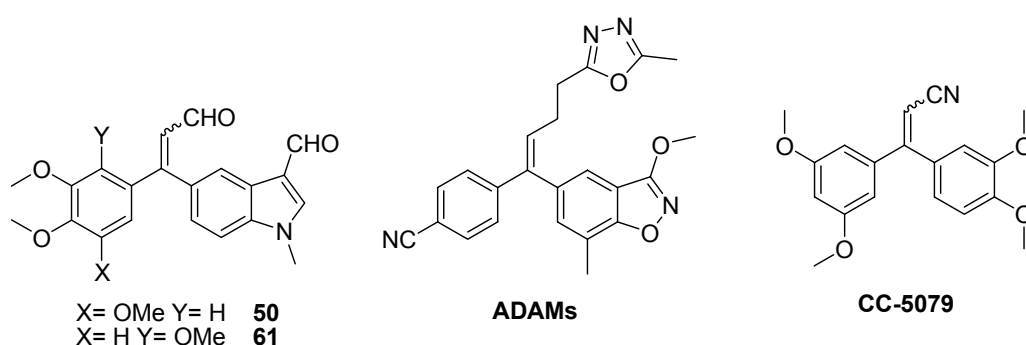


Figura 110. Formil isocombretastatinas sintetizadas en este trabajo y alquenilidendiariimetanos, análogos estructurales de las mismas.

⁷⁴ a) Cullen, M. D.; Sarkar, T.; Hamel, E.; Hartman, T. L.; Watson, K. M.; Buckheit, R. W.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Cushman, M. Inhibition of tubulin polymerization by select alkenyldiarylmethanes. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 469-473. b) Cullen, M. D.; Cheung, Y. F.; Houslay, M. D.; Hartman, T. L.; Watson, K. M.; Buckheit, R. W.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Cushman, M. Investigation of the alkenyldiarylmethane non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors as potential cAMP phosphodiesterase-4B2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1530-1533. c) Deng, B. L.; Hartman, T. L.; Buckheit, R. W.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Cushman, M. Replacement of the metabolically labile methyl esters in the alkenyldiarylmethane series of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with isoxazolone, isoxazole, oxazolone, or cyano substituents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5316-5323. d) Deng, B. L.; Hartman, T. L.; Buckheit, R. W.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Fanwick, P. E.; Cushman, M. Synthesis, anti-HIV activity, and metabolic stability of new alkenyldiarylmethane HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6140-6155. e) Wu, L.; Zhang, L. H.; Pedemonte, M.; Nazriuddin, S.; Lai, Y.; Lu, L.; Schafer, P.; Muller, G.; Stirling, D.; Payvandi, F. CC-5079 causes NF- κ B-independent apoptosis in hematopoietic cancer cell lines and in taxol and doxorubicin drug-resistant cells. *Blood* **2003**, *102*, 209B-210B. f) Zhang, L. H.; Lu, L.; Wit, L.; Robarge, M.; Liu, W.; Chen, R. S.; Muller, G. W.; Stirling, D.; Payvandi, F. CC-5079, a novel microtubule and TNF- α inhibitor with antiangiogenic and antimetastasis activity. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 6142S-6142S. g) Zhang, L. H.; Wu, L.; Raymon, H. K.; Chen, R. S.; Corral, L.; Shirley, M. A.; Narla, R. K.; Gamez, J.; Muller, G. W.; Stirling, D. I.; Bartlett, J. B.; Schafer, P. H.; Payvandi, F. The synthetic compound CC-5079 is a potent inhibitor of tubulin polymerization and tumor necrosis factor- α production with antitumor activity. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 951-959.

Además de la introducción de sustituyentes en la posición C-3 del indol, se ha explorado el efecto de reemplazar dicho carbono por un heteroátomo. Así, se han sintetizado análogos *N*-metilbenzimidazólicos y 1,3-benzoxazólicos de combretastatinas (**79** y **80**) y fenstatinas (**69-74**), unidos por distintas posiciones. La sustitución del metino del indol por un N en las combretastatinas conduce a compuestos potentes tanto en IPT como en citotoxicidad. Por el contrario, el reemplazo del metino del indol por un nitrógeno y del resto *N*-metilo por un oxígeno conduce a la pérdida de la potencia en fenstatinas. Durante la síntesis de los análogos *N*-metilbenzimidazólicos de las fenstatinas se obtuvieron los derivados unidos al puente por la posición dos, que resultaron ser poco potentes. Ésto concuerda con estudios anteriores en los que se había observado que la sustitución de uno de los anillo bencénicos de combretastatinas por anillos aromáticos de cinco miembros (benzofusionados o no) reducía notablemente la potencia.^{67,69}

Respecto a los análogos macrocíclicos, ninguno de ellos presentó actividad inhibitoria de la polimerización de tubulina.⁶⁶ Puesto que análogos que sólo difieren en la ausencia del espaciador presentan potencias elevadas,^{69,75} es razonable proponer que la pérdida de actividad se debe al espaciador. El estudio de las conformaciones accesibles a los análogos macrocíclicos con un anillo tetrasustituido sugerían que alguno de los metilenos del espaciador podían ocupar el espacio que ocupan los metoxilos de colchicina y podofilotoxina cuando se unen a la tubulina. Esto podría desplazar los metoxilos laterales del anillo aromático tetrasustituido a zonas ocupadas por la proteína, dificultando así su unión. Por ello, se sintetizaron los análogos trisustituidos, en los que la ausencia de un metoxilo podría facilitar que adoptasen una disposición más parecida a la que adoptan los análogos no macrocíclicos más potentes.⁶⁶ Sin embargo, los resultados de actividad muestran que dichos compuestos tampoco inhiben la polimerización de tubulina. Esto sugiere que la causa de que los análogos macrocíclicos no sean activos es la interacción desfavorable del espaciador con la proteína. Estudios de docking realizados con los análogos no macrocíclicos sugieren que la zona ocupada por el espaciador corresponde a la parte superior de una lámina β que forman los residuos de Val313 a Val316 y de Asn348 a Ala352.⁷¹⁻⁷³

⁷⁵ Mateo, C. Trabajo de grado, Universidad de Salamanca, 2002.

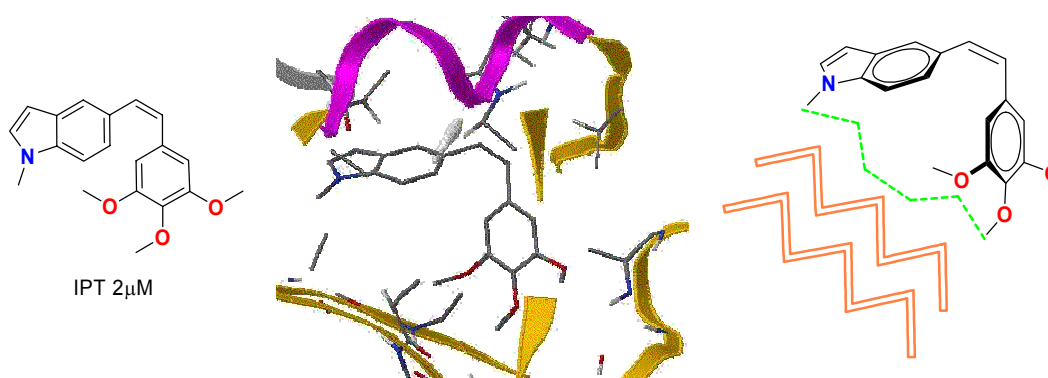


Figura 111. Representación de la combretastatina indólica no macrocíclica en el sitio de unión de la colchicina (izquierda y centro) y representación esquemática de la interacción del espaciador (en verde) de la combretastatina indólica macrocíclica con la lámina β (zig-zag naranja) del sitio de unión (a la derecha).⁷⁶

Los elementos estructurales introducidos pueden analizarse teniendo en cuenta los modelos de farmacóforo propuestos para los ligandos del sitio de la colchicina (figura 112).⁷⁷ Así, se considera que en las fenstatinas el carbonilo incrementa la potencia de IPT al comportarse como aceptor de enlace de hidrógeno frente a un dador de la proteína (indicado por una esfera de puntos azul claro). Sin embargo, isocombretastatinas que carecen de esta interacción favorable son más potentes. El anillo de pirrol del indol ocupa tres sitios del farmacóforo: una zona hidrofóbica (esfera negra), un aceptor de enlace de hidrógeno (esfera verde) y un dador de enlace de hidrógeno (esfera rosa) algo más alejado. En principio, el *N*-metilo debería ocupar la zona hidrofóbica, quedando desocupada la zona del aceptor en los indoles, pero podrían actuar como tales los nitrógenos en el caso de los benzimidazoles.

⁷⁶ <http://web.usal.es/~pelaez/Pelaez/TESIS.htm#RAKE>

⁷⁷ a) Bhattacharyya, B.; Panda, D.; Gupta, S.; Banerjee, M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 155-183. b) Zefirova, O. N.; Diikov, A. G.; Zyk, N. V.; Zefirov, N. S. Ligands of the colchicine site of tubulin: A common pharmacophore and new structural classes. *Russ. Chem. Bull.* **2007**, *56*, 680-688. c) Nguyen, T. L.; McGrath, C.; Hermone, A. R.; Burnett, J. C.; Zaharevitz, D. W.; Day, B. W.; Wipf, P.; Hamel, E.; Gussio, R. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6107-6116. d) Ducki, S.; Mackenzie, G.; Lawrence, N. J.; Snyder, J. P. Quantitative structure-activity relationship (5D-QSAR) study of combretastatin-like analogues as inhibitors of tubulin assembly. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 457-465. e) Brown, M. L.; Rieger, J. M.; Macdonald, T. L. Comparative molecular field analysis of colchicine inhibition and tubulin polymerization for combretastatins binding to the colchicine binding site on beta-tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1433-1441. f) terHaar, E.; Rosenkranz, H. S.; Hamel, E.; Day, B. W. Computational and molecular modeling evaluation of the structural basis for tubulin polymerization inhibition by colchicine site agents. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1659-1671.

Los sustituyentes en posición tres del indol podrían en principio interactuar con la lisina 350 β , cuyo grupo amino (mostrado en cpk) se podría situar cerca de los mismos, favoreciendo la interacción con grupos más polares (como por ejemplo CHO, CN). Otro sitio hidrofóbico (no mostrado) estaría ocupado por el anillo de trimetoxifenilo, que también aportaría un aceptor de enlace de hidrógeno (no mostrado) y el segundo anillo aromático ocuparía la llamada zona plana hidrofóbica

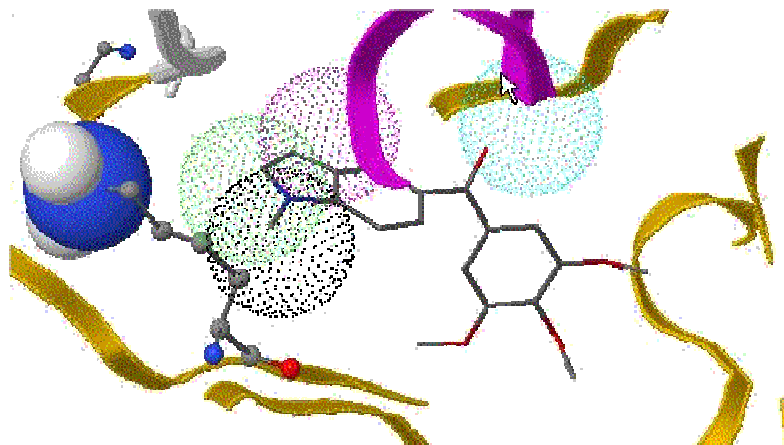


Figura 112. Representación de cuatro de los puntos del farmacóforo de los ligandos que se unen a la tubulina en el sitio de la colchicina y de la Lys 350 β (NH₂ terminal en modelo CPK).⁷⁶

A modo de resumen de los resultados obtenidos en este trabajo, cabe destacar que:

- La potencia citotóxica que presentan las isocombretastatinas es mayor que la mostrada por las fenstatinas y comparable con la de combretastatinas con potencias similares de inhibición de polimerización de tubulina.
- La presencia del resto 3,4,5-trimetoxifenilo conduce a compuestos más potentes que la presencia del resto 2,3,4-trimetoxifenilo. Sin embargo, la potencia de los compuestos con un resto 2,3,4-trimetoxifenilo se ve incrementada cuando se combina con un anillo indólico (en vez de un segundo resto fenilo).
- El resto *N*-metil-5-indolilo es un buen reemplazo del anillo aromático Ar₂ en isocombretastatinas, al igual que se había descrito en combretastatinas y fenstatinas.
- La sustitución del anillo indólico por otros heterociclos benzofusionados conduce a la pérdida de la actividad.
- La introducción de sustituyentes en la posición C-3 del *N*-metilindol conduce a compuestos de actividad variable en función del sustituyente, siendo los derivados más potentes aquellos que contienen un grupo nitrilo o una oxima.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. TÉCNICAS GENERALES.

IV.1.A. Instrumentación.

La instrumentación utilizada en cada caso es la que se cita a continuación:

- **Puntos de fusión:** BUCHI 510, en baño de silicona y no fueron corregidos.
- **Espectros IR:** Espectrofotómetro FT-IR o Nicolet Impact 410, en película, salvo indicación contraria. Los valores de la frecuencia de absorción se expresan en cm^{-1} .
- **Espectros de RMN ^1H y de RMN ^{13}C :** Espectrómetros BRUKER AC 200 (200 MHz), y BRUKER DRX 400 (400 MHz), utilizando CDCl_3 como disolvente, salvo indicación contraria. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y los de las constantes de acoplamiento (J) en Hz.
- **Espectros de gases-masas:** Se determinaron en un sistema de cromatógrafo de gases acoplado con un espectrómetro de masas que dispone de un detector de masas Hewlett-Packard 5890 series II, dotado de una columna SPB-1 de dimetilsilicona de 12 metros de longitud, 0,2 mm de diámetro interno, con un espesor de pared de 0,33 μm . Las condiciones de experimentación utilizadas son las siguientes: una vez inyectada la muestra, el detector se mantiene a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos y después se programa un gradiente de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta alcanzar la temperatura máxima de 300 $^{\circ}\text{C}$, temperatura a la cual se mantiene durante 5 minutos.

IV.1.B Técnicas cromatográficas.

- **Cromatografía flash.** Se utilizó gel de sílice MERCK 60 (0,040-0,063 mm) en proporción 30-40 g de sílice por gramo de sustancia.
- **Cromatografía de capa fina.** Se utilizaron láminas de poliéster prefabricadas POLYCHROM de 0,25 mm de espesor, con recubrimiento de gel de sílice con indicador fluorescente UV-254. Para el revelado se pulveriza con una disolución de ácido sulfúrico al 10% en etanol, o ácido fosfomolibdico al 10% en etanol, calentando a continuación a 110 °C durante unos minutos.
- **HPLC.** Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent HP Series 1100, equipado con columnas Waters X-Terra[®]MS C₈ (5µm, 4,6x150mm), Waters X-Terra[®]MS C₁₈ (5µm, 4,6x150mm) o Waters X-Terra[®]MS (5 µM, 4,6 x 150 mm)C_{fenilica}.

IV.1.C. Tratamiento de disolventes y reactivos.

- **Tolueno.** El tolueno comercial se seca sobre láminas de Na.
- **Cloruro de metileno.** El CH₂Cl₂ comercial se seca sobre tamiz molecular.
- **Hexano.** El hexano comercial se destila en columna de rectificación y se recoge sobre CaCl₂.
- **Tetrahidrofurano.** El THF comercial se destila, inmediatamente antes de su uso, sobre láminas de sodio, bajo atmósfera de argón, usando benzofenona como indicador.

IV.1.D. Modelado molecular.

Los cálculos de Modelado Molecular fueron llevados a cabo en una estación de trabajo Indy 5500 Silicon Graphics. Los compuestos fueron construidos utilizando el módulo de construcción del paquete Macromodel 5,5⁷⁸ y minimizados usando los campos de fuerzas MM3 y MMFF.

El análisis conformacional para cada compuesto se realizó mediante un protocolo de búsqueda conformacional de tipo Monte Carlo,⁷⁹ generando 1000 conformaciones para cada compuesto. Algunas de estas conformaciones se encuentran disponibles en la dirección <http://web.usal.es/~pelaez/Pelaez/TESIS.htm>

Las dinámicas moleculares a distintas temperaturas (típicamente a 300, 600, 1200 y 1500 K) se han llevado a cabo con el campo de fuerzas MM3, utilizando cloroformo como disolvente.⁸⁰ Tras un periodo de equilibrado de 200 ps, para estabilizar la simulación a la temperatura deseada, sigue una fase de producción de 3 ns, en la que se generan 1000 conformaciones.⁸¹

⁷⁸ Mohamadi, F.; Richards, N. G.; Guida, W. C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Cauley, C.; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W. C. MacroModel an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J. Comp. Chem.* **1990**, *11*, 440-467.

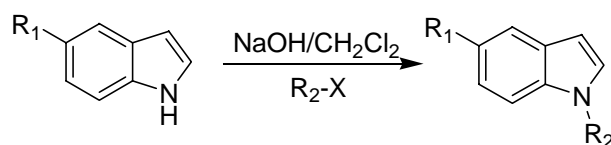
⁷⁹ a) Hallberg, A.; Isaksson, R. Martin, A. R.; Sndström, J. Chromatographic resolution, circular dichroism spectra, and absolute configurations of dimers of 5*H*-indolo[1,7-*ab*][1]benzazepine and coumarin with *C*₂ symmetry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4387-4392. b) Saunders, M.; Houk, K. N.; Wu, Y-D.; Still, W. C.; Lipton, M.; Chang, G.; Guida, W. C. Conformations of cicloheptadecane. A comparison of methods for conformational searching. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 1429-1427.

⁸⁰ a) Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J. H. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8551-8566. b) Lii, J. H.; Allinger, N. L. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 2. Vibrational frequencies and thermodynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8566-8576. c) Lii, J. H.; Allinger, N. L. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 3. The van der Waals' potentials and crystal data for aliphatic and aromatic hydrocarbons *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8576-8582.

⁸¹ Hudson, B. D.; George, A. R.; Ford, M. G.; Livingstone D. J. Structure-activity relationships of pyrethroid insecticides. Part 2. The use of molecular dynamics for conformation searching and average parameter calculation. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 191-201.

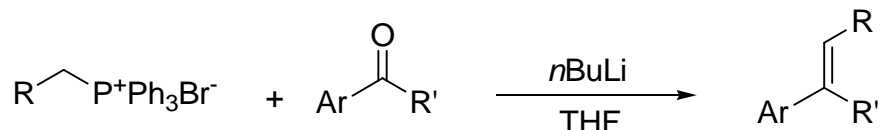
IV.2. MÉTODOS GENERALES.

IV.2.A. MÉTODO A. N-Alquilación de 1H-indoles.



A una disolución 0,25-0,26 M del derivado de indol en CH₂Cl₂ seco, se añaden 2 equivalentes de NaOH perfectamente triturada y ~1% en peso respecto del indol de *n*Bu₄N⁺ HSO₄⁻. Tras una hora en agitación en atmósfera de argón y t.a., se añaden entre 2 y 3 equivalentes del derivado halogenado (MeI o EtBr). La reacción se deja en estas condiciones durante 48 h. La mezcla de reacción se trata extrayendo con H₂O varias veces. Las fases orgánicas se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtran y evaporan, obteniéndose el indol alquilado.

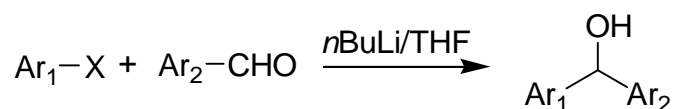
IV.2.B. MÉTODO B. Reacción de Wittig.



A una suspensión 0,08 M de sal de fosfonio en THF seco a -40°C y en atmósfera de argón, se le añaden de 0,75 a 1,1 equivalentes de *n*BuLi (1,6 M en hexano). La suspensión resultante se agita durante 1 hora. En estas condiciones, se añaden desde 0,25 a 0,90 equivalentes del compuesto carbonílico y se permite que alcance progresivamente la temperatura ambiente. Transcurridas 12-24 horas, se vierte la reacción sobre hielo y se extrae con CH_2Cl_2 . El conjunto de las fases orgánicas se lava hasta neutralidad con una disolución saturada de NaCl, se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto obtenido se purifica mediante cromatografía en columna.

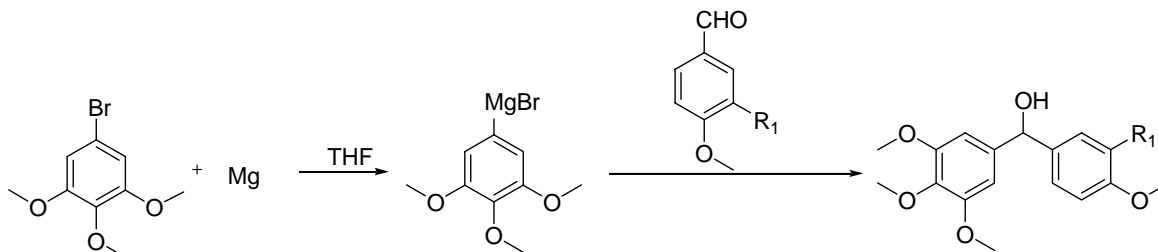
IV.2.C. MÉTODO C. Formación de diarilmetanoles.

C1. A partir de derivados organolíticos.



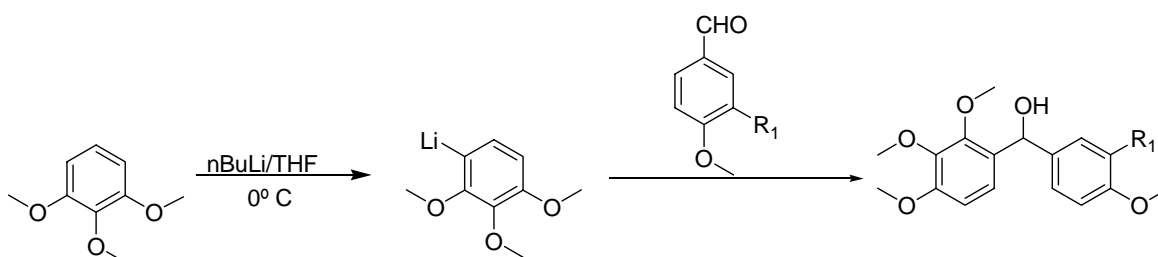
Una suspensión 2,4-45,2 mmol del derivado halogenado en THF (20-60 mL) se pone en agitación y atmósfera de argón a -78°C . Se añaden 3,0-34 mL de *n*BuLi (1,6 M) y tras 1-2 horas se adicionan lentamente 2,9-54,2 mmol (1,2 mmoles/mmol de derivado halogenado) del aldehído correspondiente y se deja subir la temperatura espontáneamente. Tras 12-24 horas, se vierte la mezcla sobre hielo y posteriormente se extrae con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se juntan y se secan con Na_2SO_4 , se filtran y evaporan.

C2. Con magnesianos.



Sobre una suspensión 6 M de Mg en THF se añade, en frío, unos cristales de I₂ y la cuarta parte del derivado bromado. Se agita hasta decoloración de la solución y a continuación se añade lentamente el resto del derivado bromado disuelto en THF y se deja en agitación una hora. Tras este tiempo, la solución obtenida se vierte sobre una disolución 3,25 M del aldehído correspondiente en THF a 0 °C y se deja en agitación hasta alcanzar temperatura ambiente. La reacción se para mediante la adición de 10 mL de una solución acuosa saturada de NH₄Cl y el bruto de reacción se obtiene tras extraer 3 veces con AcOEt, secar con Na₂SO₄, filtrar y evaporar.

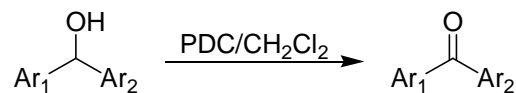
C3. Con organolíticos a partir de 1,2,3-trimetoxibenceno.



Sobre una suspensión 1,2 M de 1,2,3-trimetoxibenceno en THF a 0 °C, se añaden 0,9 equivalentes de *n*BuLi (1,6 M en hexano). La solución amarilla resultante se agita hasta decoloración entre 1 y 2 horas en atmósfera de argón. Posteriormente se añade lentamente entre 0,3 y 0,8 equivalentes del aldehído correspondiente disuelto en THF y se deja en agitación un tiempo variable entre 12 y 24 horas. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se trata con agua y hielo y se extrae con CH₂Cl₂ tres veces. El conjunto de las fases orgánicas se lava con disolución saturada de NaCl hasta pH neutro de las aguas de lavado, se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El producto obtenido se purifica por cromatografía en columna.

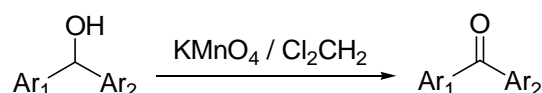
IV.2.D. MÉTODO D. Oxidación de diarilmetanoles.

D1. Con PDC.



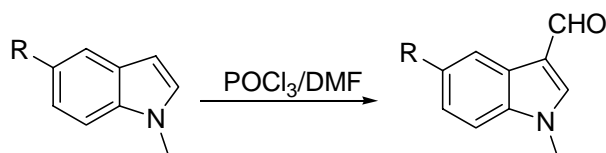
Sobre una disolución a 0 °C del diarilmetanol en cloruro de metileno seco, se añade 1,5 equivalentes de PDC, se deja alcanzar temperatura ambiente y tras 4-24 h se filtra a través de celita y se evapora para obtener el bruto de reacción.

D2. Con KMnO₄



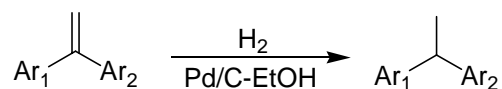
A una disolución del diarilmetanol en cloruro de metileno se añaden entre 2,5 y 5 equivalentes de permanganato potásico, 20 mg del catalizador de transferencia de fase (hidrogenosulfato de tetrabutil amonio) y 1 mL de agua y se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Se filtra por alúmina usando como eluyente cloruro de metileno, se evapora y el producto obtenido se purifica mediante cromatografía de columna.

IV.2.E. MÉTODO E. Formilación.



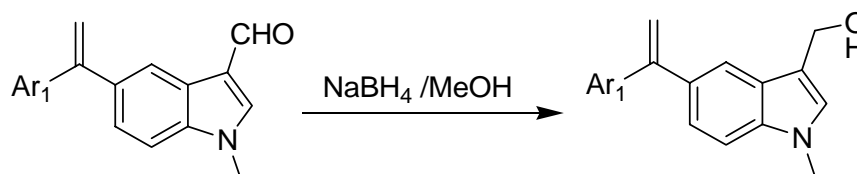
Sobre 1-5 mL de DMF seca a 0 °C (CaCl₂) se añade 1 equivalente de POCl₃ y se mantiene en agitación durante media hora, tras la cual, se adiciona el derivado indólico y se calienta a 60 °C. Después de 2 horas, la solución resultante se vierte sobre hielo con acetato sódico, se añade agua y se deja en la nevera durante 24 horas. El precipitado obtenido se redisuelve en CH₂Cl₂, se seca con NaSO₄ anhidro, se filtra y se evapora.

IV.2.F. MÉTODO F. Hidrogenaciones de dobles enlaces.



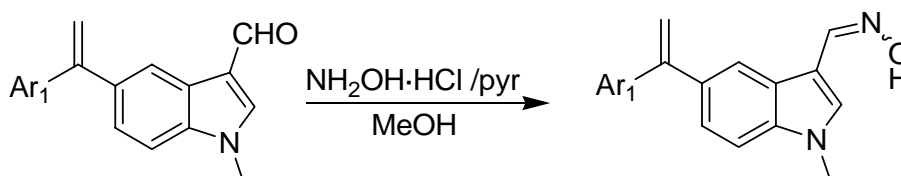
A una disolución 0,01-0,02 M de la olefina en EtOH se le añaden cantidades catalíticas de Pd/C y se deja en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de H₂ durante 16-24 horas. Transcurrido este tiempo, se filtra a través de sílice y se evapora el disolvente.

IV.2.G. MÉTODO G. Reducción con NaBH₄.



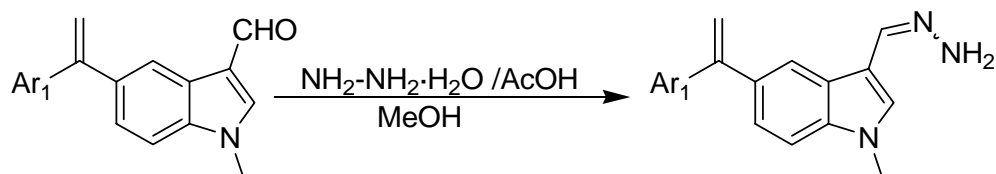
A una disolución 0,01-0,02 M de aldehído en 10-15 mL de MeOH, se añade un exceso de NaBH₄ y se mantiene en agitación. Transcurrida media hora, se evapora el MeOH y el residuo resultante se redisuelve en CH₂Cl₂ y se lava con agua hasta pH neutro. Las fases orgánicas se secan con Na₂SO₄, se filtran y se evaporan.

IV.2.H. MÉTODO H. Formación de oximas.



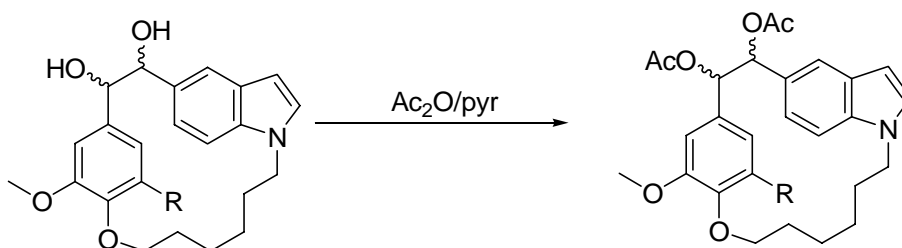
A una disolución 0,02-0,06 M de aldehído en 10-25 mL de MeOH, se añade 1,2-15,5 mmol de NH₂OH·HCl (10 mmol/mmol de aldehído) y 2-4 gotas de piridina. La reacción se mantiene a reflujo durante 12-24 horas. Tras este tiempo, se evapora el disolvente y el producto bruto se redisuelve en CH₂Cl₂ y se extrae con agua. Las fases orgánicas se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtran y evaporan.

IV.2.I. MÉTODO I. Formación de hidrazonas.



A una disolución 0,02-0,06 M de aldehído en 10-25 mL de MeOH, se añade 2,4-15,5 mmol de $\text{NH}_2\text{-NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol/mmol de cetona) y 2-4 gotas de ácido acético glacial. La reacción se mantiene a reflujo 12-48 horas. Tras este tiempo, se evapora el disolvente y el producto bruto se redissuelve en CH_2Cl_2 y se extrae con agua. Las fases orgánicas se secan con Na_2SO_4 anhidro, se filtran y evaporan.

IV.2.J. MÉTODO J. Acetilaciones.

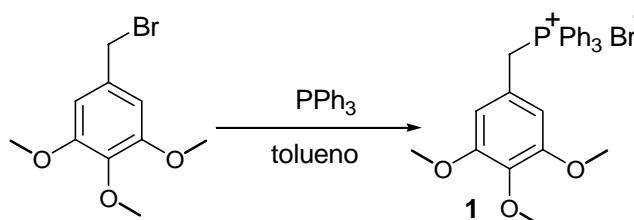


El material de partida se disuelve en piridina y posteriormente se añade anhídrido acético y se somete a agitación durante 20-24 horas. Después de ese tiempo, la reacción se recoge sobre HCl 2N y AcOEt , se lava con NaOH 4% y con una disolución acuosa saturada de NaCl hasta neutralización de las aguas de lavado. El conjunto de las fases orgánicas se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora. Los productos de reacción se aíslan por cromatografía en columna de gel de sílice.

IV.3. SÍNTESIS DE COMPUESTOS NO MACROCÍCLICOS.

IV.3.A. Materiales de partida.

Obtención de Bromuro de 3,4,5-trimetoxibenciltrifenilfosfonio (1).

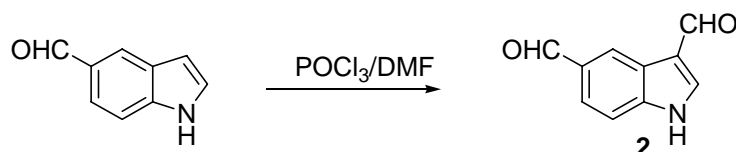


Sobre una disolución de 4,12 g (15,8 mmol) de bromuro de 3,4,5-trimetoxibencilo en tolueno seco (20 mL) y en agitación, se añaden 5,63 g (21,5 mmol) de trifetilfosfina disuelta en tolueno seco (15 mL). Se continúa la agitación durante 23 h a temperatura ambiente, observándose la formación de un sólido. Después de filtrar y secar se obtienen 6,26 g (76,0%) de un sólido blanco, que corresponde al bromuro 1.

Bromuro de 3,4,5-trimetoxibenciltrifenilfosfonio (1):

RMN ¹H: 3,48 (6H, s, OCH₃); 3,75 (3H, s, OCH₃); 5,36 (2H, d, *J*=14,2; CH₂P); 6,46 (2H, s, Ar); 7,1-7,9 (15H, m, Ar).

Obtención de 1*H*-indol-3,5-dicarbaldehído(2).



Seguendo el método E, la adición de 1,5 g (10,34 mmol) de 1*H*-indol-5-carbaldehído sobre una disolución de 960 mL (10,34 mmol) de POCl₃ en 3 mL de DMF generan 515 mg (29%) de **2**.

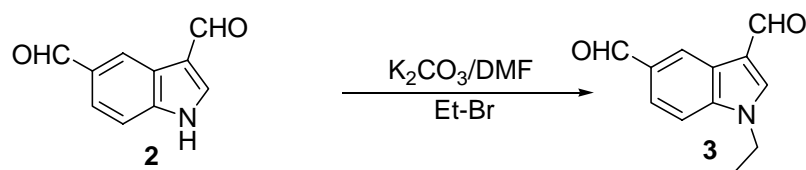
1*H*-indol-3,5-dicarbaldehído (2):

IR (pastilla de KBr): 1665, 1611, 1440, 1183, 790 cm⁻¹.

P.f.: 175-185 °C. (CH₂Cl₂/Hex).

RMN ¹H: 7,37 (1H, d; *J*=8,4, H₇); 7,62 (1H, dd; *J*=8,4; 1,4, H₆); 7,89 (1H, d; *J*=1,4, H₄); 8,54 (1H, sa, H₂); 9,80 (1H, s, CHO); 9,83 (1H, s, CHO).

Obtención del *N*-etil-1*H*-indol-3,5-dicarbaldehído (3).



A una disolución de 230 mg (1,33 mmol) de dialdehído en DMF seca se le añade un exceso de carbonato de potasio (3 g) y se mantiene en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y atmósfera inerte. A continuación se añaden 0,2 mL (2,66 mmol) de bromuro de etilo y se aumenta la temperatura hasta 70 °C. Transcurridas 48 horas la mezcla de reacción se vierte sobre hexano y se filtra para eliminar las sales. A continuación se evapora el filtrado, se redisuelve en CH₂Cl₂, se lava con NaOH al 4% y con agua saturada de NaCl hasta pH neutro de las aguas de lavado. El conjunto de las fases orgánicas se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad para obtener 180 mg (67%) de **3**.

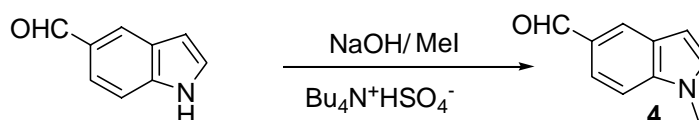
N-etil-1H-indol-3,5-carbaldehído (3):

IR (película): 1687, 1662, 1191 cm^{-1} .

RMN ^1H : 1,54 (3H, t; $J=7,2$, CH_3); 4,25 (2H, c, $J=7,2$, CH_2); 7,44 (1H, d; $J=8,6$, H_7); 7,84 (1H, s, H_2); 7,85 (1H, dd; $J=8,6$; 1,6, H_6); 8,73 (1H, d; $J=1,6$, H_4); 9,99 (1H, s, CHO); 10,04 (1H, s, CHO).

RMN ^{13}C : 15,0 (CH_3); 42,1 (CH_2); 110,8 (CH); 118,8 (C); 123,4 (CH); 125,0 (C); 126,8 (CH); 131,7 (C); 139,7 (CH); 140,1 (C); 184,5 (CH); 192,1 (CH).

Obtención del N-metil-1H-indol-5-carbaldehído(4).



Siguiendo el método A, la adición sobre una disolución de 1,56 g (10,8 mmol) de 1H-indol-5-carbaldehído en 40 mL de CH_2Cl_2 seco, de 2 mL (32,3 mmol) de ioduro de metilo, 0,86 g (21,6 mmol) de NaOH y 20 mg de $n\text{-Bu}_4\text{N}^+\text{HSO}_4^-$, produce 1,60 g (93,0%) del compuesto 4.

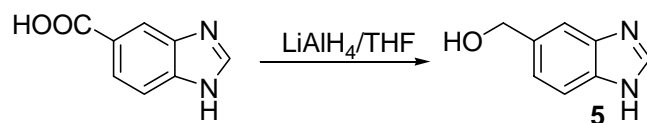
N-metil-1H-indol-5-carbaldehído(4):

P.f.= 85 $^\circ\text{C}$ (metil *terc*butil éter).

RMN ^1H : 3,76 (3H, s, CH_3); 6,55 (1H, d; $J=3,3$, H_3); 7,10 (1H, d; $J=3,3$, H_2); 7,41 (1H, d; $J=8,8$, H_7); 7,80 (1H, dd; $J=8,8$; 1,9, H_6); 8,05 (1H, d; $J=1,9$, H_4); 9,92 (1H, s, CHO).

RMN ^{13}C : 32,6 (CH_3); 103,1 (CH); 109,8 (CH); 121,4 (CH); 126,1 (CH); 128,2 (C); 129,1 (C); 130,9 (CH); 139,8 (C); 192,3 (CH).

Obtención de 1H-benzimidazol-5-ilmetanol (5).



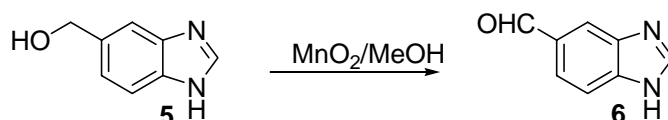
A una suspensión de 2,00 g (12,35 mmol) de ácido 1H-benzimidazol-5-carboxílico en 50 mL de THF seco, en atmósfera de argón, se añaden 938 mg (24,7 mmol) de LiAlH₄ y se calienta a 65 °C. Transcurridas 48 horas la mezcla de reacción se vierte sobre AcOEt, se añade EtOH, se filtra para retirar las sales de litio generadas y se evapora, obteniéndose 1,4 g (75%) de 1H-benzimidazol-5-ilmetanol que se utilizarán en la siguiente reacción sin más purificación.

1H-Benzimidazol-5-ilmetanol (5):

RMN ¹H: 4,60 (2H, s, CH₂); 7,08 (1H, dd; *J*=8,4; 1,6, H₆); 7,45 (1H, d; *J*=8,4, H₇); 7,49 (1H, sa, H₄); 7,94 (1H, s, H₂).

RMN ¹³C: 65,9 (CH₂); 115,2 (CH); 116,3 (CH); 121,3 (CH); 136,1 (C); 140,6 (C); 141,0 (C); 146,0 (CH).

Obtención de 1H-benzimidazol-5-carbaldehído (6).



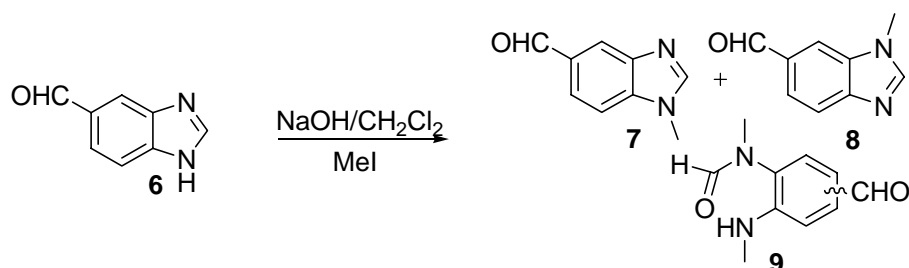
4,94 g (56,75 mmol) de MnO₂ se añaden sobre una disolución de 1,40 g (9,46 mmol) de **5** en 50 mL de MeOH. Tras 48 horas en agitación y a temperatura ambiente, se filtra la mezcla de reacción, el filtrado se pasa a través de sílice y se evapora obteniendo 1,24 g (90%) de 1H-benzimidazol-5-carbaldehído.

1H-Benzimidazol-5-carbaldehído (6):

RMN ¹H: 7,55 (1H, d; *J*=8,4, H₇); 7,65 (1H, dd; *J*=8,4; 1,4, H₆); 8,01 (1H, sa, H₄); 8,24 (1H, s, H₂); 9,85 (1H, s, CHO).

RMN ¹³C: 116,3 (CH); 120,5 (CH); 124,5 (CH); 133,1 (C); 139,7 (C); 142,8 (C); 145,9 (CH); 194,0 (CH).

Obtención de 1-metil-1*H*-benzimidazol-5-carbaldehído (7) y de 1-metil-1*H*-benzimidazol-6-carbaldehído (8).



A una disolución de 1,24 g (8,49 mmol) de 1*H*-benzimidazol-5-carbaldehído en 50 mL de una mezcla CH₂Cl₂:H₂O (3:2), se añaden 700 mg (17,5 mmol) de NaOH triturado y 40 mg del catalizador Bu₄N⁺HSO₄⁻. Después de 1 hora en agitación, se añaden 1,33 mL (21,2 mmol) de MeI. Transcurridas 24 horas, la mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂, se lava con una solución acuosa saturada de NaCl, se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora, obteniéndose 900 mg de crudo de reacción. Mediante purificación por cromatografía en columna, usando como eluyente CH₂Cl₂/AcOEt 1/1, se obtienen 70 mg (4,3%) del subproducto 9 y 600 mg (44%) de una mezcla 1:1 de 7 y 8.

N-metilbenzimidazol-5-carbaldehído (7) / N-metilbenzimidazol-6-carbaldehído (8):

RMN ¹H: 3,60 (3H, s); 3,63 (3H, s); 7,17 (1H, d; *J*=8,4, H₇); 7,56 (1H, dd; *J*=8,4; *J*=1,6, H₆); 7,56 (1H, dd; *J*=8,4; 1,6, H₆); 7,59 (1H, d; *J*=8,4, H₇); 7,61 (1H, s, H₂); 7,77 (1H, s, H₂); 7,82 (1H, d; *J*=1,6, H₄); 7,98 (1H, d; *J*=1,6, H₄); 9,78 (1H, s, CHO); 9,79 (1H, s, CHO).

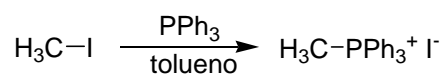
RMN ¹³C: 31,2 (2) (CH₃); 110,1 (CH); 111,8 (CH); 120,2 (CH); 123,2 (CH); 123,5 (CH); 123,8 (CH); 131,3 (C); 131,5 (C); 134,5 (C); 138,7 (C); 143,4 (C); 145,9 (CH); 147,0 (CH); 148,1 (C); 191,7 (CH); 191,9 (CH).

N-(4/5-formil-2-metilamino)fenil)-N-metilformamida (9):

RMN ¹H: 2,89 (3H, d; *J*=5, CH₃); 3,07 (3H, s, CH₃); 6,66 (1H, d; *J*=8,4); 7,47 (1H, d; *J*=1,4); 7,70 (1H, dd; *J*=8,4; 1,6); 8,00 (1H, s); 9,64 (1H, s, CHO).

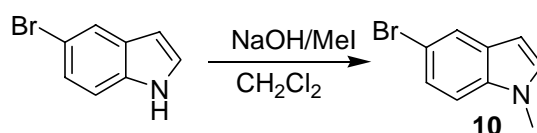
RMN ¹³C: 29,8 (CH₃); 32,2 (CH₃); 109,9 (CH); 125,3 (C); 126,6 (C); 129,9 (CH); 133,4 (CH); 151,2 (C); 163,7 (CH); 189,7 (CH).

Obtención de ioduro de metiltrifenilfosfonio.



Sobre una disolución de 5 g de ioduro de metilo en tolueno seco (20 mL) y en agitación, se añaden 5 g de trifenilfosfina. La reacción se deja en agitación y atmósfera de argón durante 24 horas, observándose la aparición de un sólido blanco. Se filtra, se seca, y se obtiene el ioduro de metiltrifenilfosfonio de forma cuantitativa.

Obtención de 1-metil-5-bromo-1H-indol (10).



Según el método A, 2,5 g (12,7 mmol) de 5-bromo-1H-indol, 1,12 g (28,1 mmol) de NaOH, 25 mg de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio y 2,3 mL (37 mmol) de yoduro de metilo, reaccionan para dar 2,3 g del compuesto metilado **10** (86%).

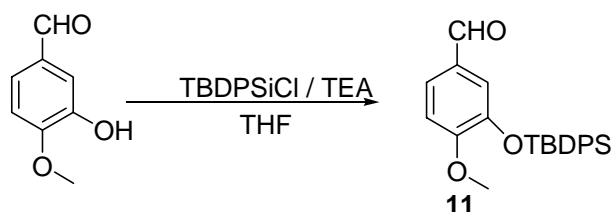
1-metil-5-bromo-1H-indol (10):

IR (película): 1051, 793, 775 cm⁻¹.

RMN ¹H: 3,77 (3H, s, CH₃); 6,42 (1H, d; *J*=3,1, H₃); 7,05 (1H, d; *J*=3,1, H₂); 7,19 (1H, d; *J*=8,5, H₇); 7,29 (1H, dd; *J*=8,5; 1,9, H₆); 7,75 (1H, d; *J*=1,9, H₄).

RMN ¹³C: 32,8 (CH₃); 100,8 (CH); 111,2 (CH); 112,9 (C); 123,4 (CH); 124,3 (CH); 130,5 (CH); 130,5 (C); 135,6 (C).

Obtención de 4-metoxi-3-*terc*butildifenilsiloxibenzaldehído (11).



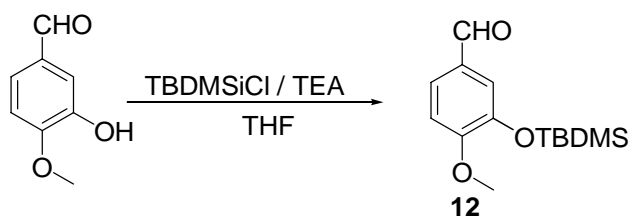
A una disolución de 2,00 g (13,16 mmol) de 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído en 75 mL de THF seco, se añaden 4,52 g (16,45 mmol) de TBDPSiCl. Se enfría a 0 °C y se añaden lentamente 2,29 mL (16,45 mmol) de trietilamina. Después de 24 horas, se filtra, se evapora, se redissuelve en éter, se filtra a través de una capa de alúmina neutra y una capa de carbón activo y se evapora a vacío, obteniéndose 5,54 g de bruto de reacción, que se purifican mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice para obtener 2,05 g (5,25 mmol 40%) del producto **11**.

4-Metoxi-3-*terc*butildifenilsiloxibenzaldehído (11):

RMN ¹H: 1,12 (9H, s, *t*Bu); 3,56 (3H, s, OCH₃); 6,80 (1H, d; *J*=8,6, H₅); 7,29-7,43 (8H, m); 7,66-7,70 (4H, m); 9,66 (1H, s, CHO).

RMN ¹³C: 20,0 (C); 26,9 (3) (CH₃); 55,3 (CH₃); 111,5 (CH); 120,0 (CH); 126,2 (CH); 127,8 (4) (CH); 130,0 (2) (CH); 133,2 (2) (C); 135,4 (4) (CH); 135,9 (C); 145,6 (C); 156,3 (C); 191,0 (CH).

Obtención de 4-metoxi-3-*terc*butildimetilsiloxibenzaldehído (12).



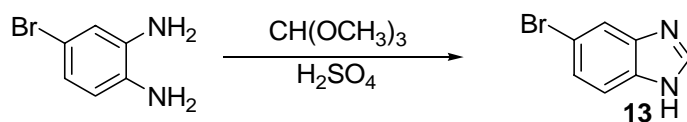
A una disolución de 2,05 g (13,48 mmol) de 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído en 75 mL de THF seco, se añaden 2,50 g (16,67 mmol) de TBDMSiCl. Se enfría a 0 °C y se añaden lentamente 2,32 mL (16,67 mmol) de trietilamina. Después de 24 horas, se filtra, se evapora, se redissuelve en éter, se filtra a través de una capa de alúmina neutra y una capa de carbón activo y se evapora a vacío, obteniéndose 2,88 g (10,82 mmol, 80%) de bruto de reacción, que se utilizan sin purificar en el siguiente paso.

4-Metoxi-3-*tert*butildimetilsiloxibenzaldehído (12):

RMN ¹H: 0,17 (6H, s, SiCH₃); 1,00 (9H, s, *t*Bu); 3,90 (3H, s, OCH₃); 6,96 (1H, d; *J*=8,2, H₅); 7,37 (1H, d; *J*=2,2, H₂); 7,48 (1H, dd; *J*=8,2, 2,2, H₆); 9,82 (1H, s, CHO).

RMN ¹³C: -4,6 (2) (CH₃); 18,4 (C); 25,6 (3) (CH₃); 55,6 (CH₃); 111,2 (CH); 119,9 (CH); 126,4 (CH); 130,2 (C); 145,6 (C); 156,6 (C); 190,9 (CH).

Obtención de 5-bromo-1*H*-benzimidazol (13).



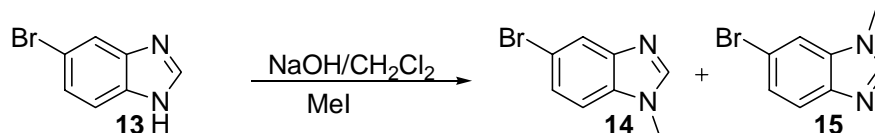
A una disolución de 2,00 g (10,7 mmol) de 4-bromo-1,2-diaminobenceno en 30 mL de tolueno, se añaden 1,17 mL (10,7 mmol) de ortoformiato de trimetilo. A continuación se dejan caer, gota a gota, desde un embudo de adición compensada, 0,3 mL de H₂SO₄ disueltos en 5 mL de tolueno y se calienta a 120 °C. Transcurridos 4 días, la mezcla de reacción se vierte sobre Na₂CO₃ anhidro, se añade AcOEt, se filtra, lavando el precipitado con MeOH y se evapora para obtener de forma cuantitativa el 5-bromobenzimidazol.

5-bromo-1*H*-benzimidazol (13):

RMN ¹H: 7,12 (1H, dd; *J*=8,8; 1,8, H₆); 7,28 (1H, d; *J*=8,8, H₇); 7,58 (1H, d; *J*=1,8, H₄); 7,99 (1H, s, H₂).

RMN ¹³C: 117,1 (CH); 118,4 (CH); 120,5 (C); 130,8 (CH); 131,0 (C); 132,9 (C); 142,2 (CH).

Obtención de 1-metil-5-bromo-1*H*-benzimidazol (**14**) y 1-metil-6-bromo-1*H*-benzimidazol (**15**).



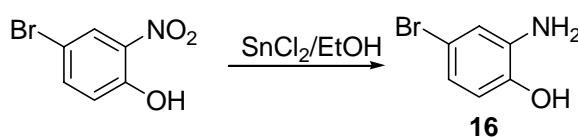
Siguiendo el método A, la adición de 1,44 mL (23 mmol) de MeI a una disolución de 2,00 g (10,2 mmol) de 5-bromobenzimidazol, 850 mg (21,2 mmol) de NaOH y 30 mg de Bu₄N⁺HSO₄⁻ en 50 mL de una mezcla CH₂Cl₂/H₂O (4/1), producen 1,65 g de producto bruto. Después de cromatografiar en columna de gel de sílice, usando como eluyente CH₂Cl₂/AcOEt 1/1, se obtienen 1,13 g (53%) de una mezcla de **14** y **15**.

1-metil-5-bromo-1*H*-benzimidazol (**14**) y 1-metil-6-bromo-1*H*-benzimidazol (**15**):

RMN ¹H: 3,60 (6H, s, NCH₃); 7,04 (1H, d; *J*=8,4, H₇); 7,23 (2H, dd; *J*=8,8; 1,8); 7,34 (1H, d; *J*=1,8); 7,52 (1H, d; *J*=8,4); 7,68 (2H, s, H₂); 7,81 (1H, d; *J*=1,8).

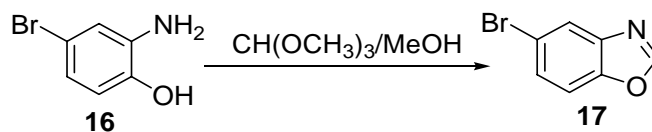
RMN ¹³C: 31,1 (2) (CH₃); 110,7 (CH); 112,5 (CH); 115,1 (C); 116,1 (C); 121,4 (CH); 122,8 (CH); 125,3 (CH); 125,8 (CH); 133,4 (C); 135,5 (C); 142,5 (C); 144,2 (CH); 144,5 (CH); 144,8 (C).

Obtención de 2-amino-4-bromofenol (**16**).



Una disolución de 1,50 g (6,9 mmol) de 4-bromo-2-nitrofenol y 6,3 g (34,5 mmol) de SnCl₂ en 10 ml de etanol absoluto se calienta a 70°C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de 30 minutos, la solución se deja enfriar y se vierte sobre hielo. A continuación, se adiciona, lentamente, solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% hasta conseguir un pH ligeramente básico. La solución obtenida se extrae con AcOEt, el conjunto de las fases orgánicas se lava con una solución acuosa saturada de NaCl, se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora para obtener 0,95 g (5,1 mmol, 73%) de **16**.

Obtención de 5-bromo-1,3-benzoxazol (17).



A una disolución de 850 mg (4,5 mmol) de 4-bromo-2-aminofenol y 0,75 mL (6,9 mmol) de ortoformiato de trimetilo en 1,5 mL de metanol, a temperatura ambiente, se añaden 20 μ L de HCl concentrado. La mezcla se calienta lentamente en un aparato de destilación simple hasta alcanzar 90-95 °C, temperatura que se mantiene hasta la destilación completa del metanol. A continuación, se extrae el residuo con éter y el conjunto de las fases orgánicas se lava con NaOH al 5% y agua, se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora para obtener 512 mg de crudo de reacción, que se cromatografían en columna de sílice usando como eluyente éter de petróleo y AcOEt en una proporción 9/1. Finalmente se obtienen 384 mg (1,94 mmol, 43%) de 5-bromo-1,3-benzoxazol.

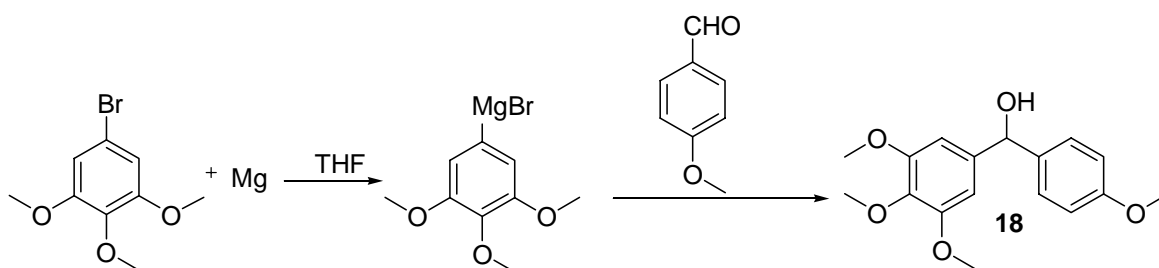
5-bromo-1,3-benzoxazol (17):

RMN ¹H (500MHz; CDCl₃): 7,33 (1H, d; *J*=8,5, H₆), 7,37 (1H, dd; *J*= 8,5; 2,0; H₆), 7,83 (1H, d; *J*= 2,0; H₄), 8,05 (1H, s, H₂).

RMN ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 112,1 (CH); 117,3 (C); 123,5 (CH); 128,6 (CH); 141,6 (C); 148,8 (C); 153,5 (CH).

IV.3.B. Síntesis de fenstatinas e isocombretastatinas difenílicas.

Obtención de (4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (18).

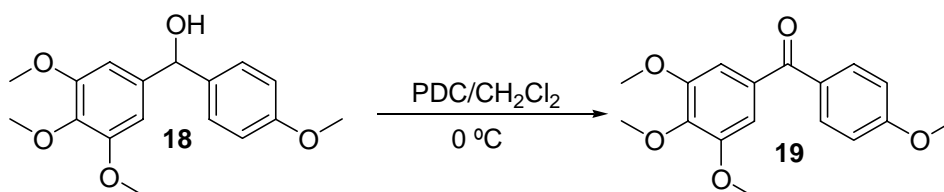


Siguiendo el método C2, a una suspensión de 304 mg (12,15 mmol) de magnesio en 2,5 mL de THF seco se añaden 2,00 g (8,1 mmol) de 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno y 5 mg de yodo. A continuación, la suspensión blanquecina se añade sobre 1,10 g (8,1 mmol) de *p*-anisaldehído disueltos en 3 mL de THF a 0 °C. Después de 1 hora, se obtienen 3,04 g de bruto de reacción, que se purifican por cristalización en CH₂Cl₂ / Hex.

(4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (18):

RMN ¹H: (Fig. Ia) 3,80 (3H, s, OCH₃); 3,83 (9H, s, OCH₃); 5,74 (1H, sa, CHOH); 6,60 (2H, s, H₂, H₆); 6,87 (2H, d; *J*=8,6, H₃, H₅); 7,29 (2H, d; *J*=8,6; H₂, H₆).

RMN ¹³C: (Fig. Ib) 55,3 (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 75,9 (CH); 103,4 (2) (CH); 114,0 (2) (CH); 128,0 (2) (CH); 131,4 (C); 136,4 (C); 139,7 (C); 153,3 (2) (C); 159,2 (C).

Obtención de (4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (19).

Siguiendo el método D1, a una solución de 668 mg (2,2 mmol) de **18** en 25 mL de CH₂Cl₂ seco a 0 °C se añaden 1,24 g (3,30 mmol) de PDC. Después de 24 horas, se obtienen 646 mg (97%) del producto de oxidación **19**.

(4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (19):

RMN ¹H: (Fig. IIa) 3,88 (6H, s, OCH₃); 3,90 (3H, s, OCH₃); 3,93 (3H, s, OCH₃); 6,97 (2H, d; *J*=9, H₃, H₅); 7,02 (2H, s, H₂, H₆); 7,83 (2H, d; *J*=9, H₂, H₆).

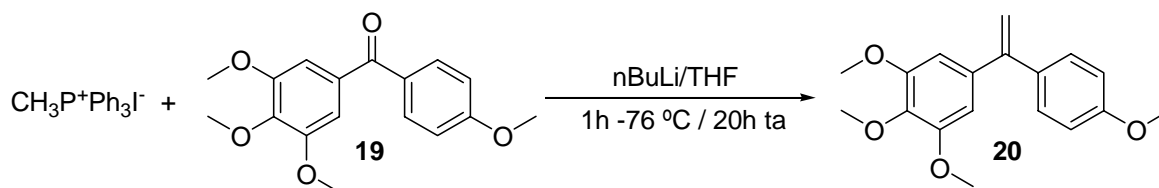
RMN ¹³C: (Fig. IIb) 55,6 (CH₃); 56,3 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 107,4 (2) (CH); 113,6 (2) (CH); 130,3 (C); 132,4 (2) (CH); 133,4 (C); 141,6 (C); 152,8 (2) (C); 163,2 (C); 194,7 (C).

EM: 302 (M⁺).

HPLC: Columna C₁₈ *t*_R: 13,93 min.

 Columna C₈ *t*_R: 13,06 min.

 Columna fenólica *t*_R: 13,00 min.

Obtención de 5-[1-(4-metoxifenil)vinil]-1,2,3-trimetoxibenceno (20).

Siguiendo el método B, a una suspensión de 250 mg (0,62 mmol) de ioduro de metiltrifenilfosfonio en 5 mL de THF seco, se añaden 0,32 mL (0,51 mmol) de *n*-Buli (1,6 M en hexano) y 102 mg (0,34 mmol) de (4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona. Después de 20 horas, el crudo de reacción, 299 mg, se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (Hex/AcOEt 4/1) y se obtienen 25 mg (25%) del producto metilénico (**20**).

5-[1-(4-metoxifenil)vinil]-1,2,3-trimetoxibenceno (20):

IR (película): 1580, 1507, 1242, 1126, 1031, 895, 839 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. IIIa) 3,81 (6H, s, OCH_3); 3,83 (3H, s, OCH_3); 3,88 (3H, s, OCH_3); 5,32 (1H, sa, $\text{C}=\text{CH}_2$); 5,37 (1H, sa, $\text{C}=\text{CH}_2$); 6,56 (2H, s, H_2, H_6); 6,87 (2H, d; $J=8,2$, H_2, H_6); 7,30 (2H, d; $J=8,2$, H_3, H_5).

RMN ^{13}C : (Fig. IIIb) 55,3 (CH_3); 56,1 (2) (CH_3); 61,0 (CH_3); 105,6 (2) (CH); 112,6 (CH_2); 113,5 (2) (CH); 129,5 (2) (CH); 133,7 (2) (C); 137,6 (C); 149,6 (C); 152,9 (2) (C); 159,4 (C).

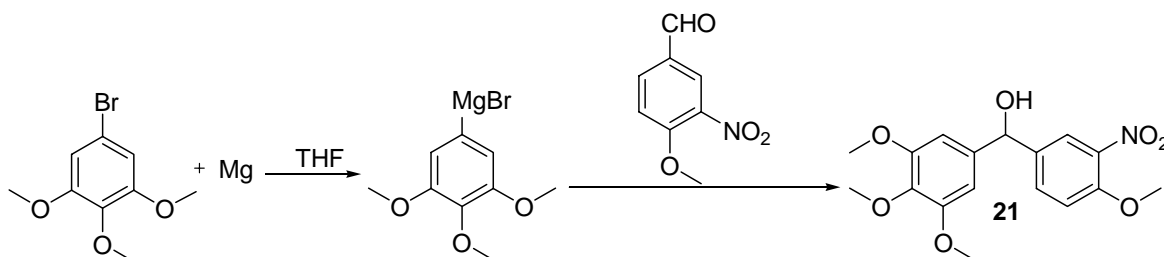
EM: 300 (M^+).

HPLC: Columna C_{18} t_R : 14,18 min.

Columna C_8 t_R : 12,89 min.

Columna fenólica t_R : 13,73 min.

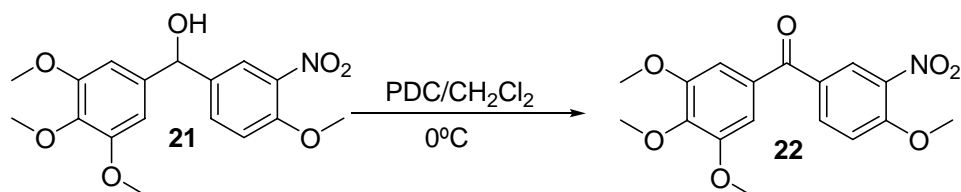
Obtención de (4-metoxi-3-nitrofenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (21).



Seguendo el método C2, a una suspensión de 304 mg (12,15 mmol) de magnesio en 2,5 mL de THF seco, se añaden 2,00 g (8,1 mmol) de 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno y 5 mg de yodo. A continuación, la suspensión blanquecina se añade sobre 1,46 g (8,1 mmol) de 4-metoxi-3-nitrobenzaldehído disueltos en 3 mL de THF a 0 °C. Después de 1 hora, se obtienen 3,90 g de bruto de reacción que se utilizan en el siguiente paso sin purificar.

(4-metoxi-3-nitrofenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (21):

RMN ^1H crudo de reacción: (Fig. IV, señales asignadas a **21**) 3,83 (6H, s, OCH_3); 3,85 (3H, s, OCH_3); 3,94 (3H, s, OCH_3); 5,74 (1H, s, CHOH); 6,55 (2H, s, H_2, H_6); 7,04 (1H, d; $J=8,6$, H_5); 7,55 (1H, dd; $J=8,6$; 2,3, H_6); 7,90 (1H, d; $J=2,3$, H_2).

Obtención de (4-metoxi-3-nitrofenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (22).

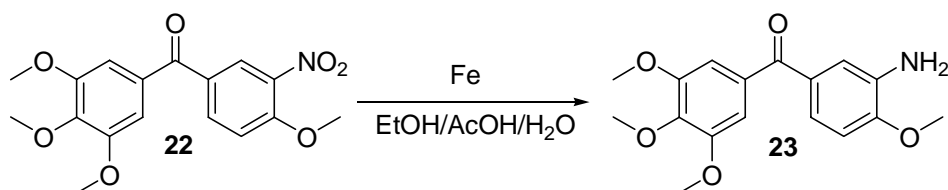
Seguindo el método D1, a una solución de 3,90 g (11,19 mmol) de (4-metoxi-3-nitrofenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol en 125 mL de CH₂Cl₂ seco a 0 °C, se añaden 6,31 g (16,78 mmol) de PDC. Después de 24 horas, se obtienen 4,01 g de bruto de reacción que se purifican por cristalización en CH₂Cl₂/Hex, obteniéndose 1,01 g (26%) del producto de oxidación **22**.

(4-metoxi-3-nitrofenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (22):

RMN ¹H: (Fig. Va) 3,89 (6H, s, OCH₃); 3,95 (3H, s, OCH₃); 4,07 (3H, s, OCH₃); 7,01 (2H, s, H₂, H₆); 7,21 (1H, d; *J*=8,8, H₅); 8,08 (1H, dd; *J*=8,8; 2,4, H₆); 8,34 (1H, d; *J*=2,4, H₂).

RMN ¹³C: (Fig. Vb) 56,4 (2) (CH₃); 57,0 (CH₃); 61,1 (CH₃); 107,5 (2) (CH); 113,3 (CH); 127,9 (CH); 129,9 (C); 131,8 (C); 135,8 (CH); 139,1 (C); 153,1 (2) (C); 153,4 (C); 155,8 (C); 192,5 (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,19 min.
 Columna C₈ t_R: 13,07 min.
 Columna fenólica t_R: 13,73 min.

Obtención de (3-amino-4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (23).

Sobre una mezcla de etanol, ácido acético y agua (2:2:1) se añade una gota de HCl concentrado, 347 mg (1,00 mmol) de **22** y 431 mg (7,72 mmol) de Fe y se calienta a 100 °C. Transcurrida media hora, se deja enfriar la mezcla y se pasa a través de celita. A continuación, se lava con agua, se extrae con CHCl₃, se lava con una solución acuosa de NaHCO₃ al 5% y con agua saturada de NaCl, se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente Hex/AcOEt 1/1) y se obtienen 95 mg (30%) de la aminofenstatina **23**.

(3-amino-4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (23):

RMN ¹H: (Fig. VIa) 3,88 (6H, s, OCH₃); 3,92 (3H, s, OCH₃); 3,95 (3H, s, OCH₃); 6,87 (1H, d; *J*=8,6, H₃); 7,03 (2H, s, H_{2'}, H_{6'}); 7,33 (1H, da; *J*=8,6, H₄); 7,42 (1H, sa, H₆).

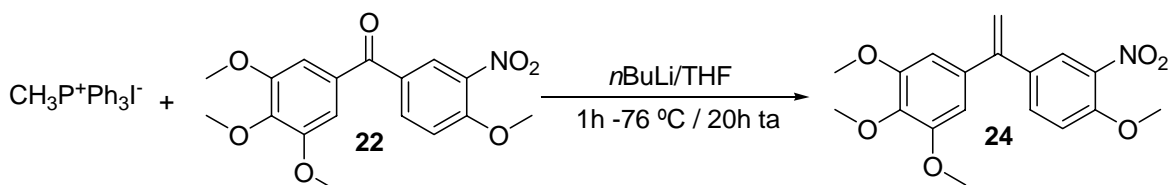
RMN ¹³C: (Fig. VIb) 55,7 (CH₃); 56,3 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 107,5 (2) (CH); 109,0 (CH); 115,9 (CH); 122,4 (CH); 130,6 (C); 133,7 (C); 136,3 (C); 141,4 (C); 150,9 (C); 152,8 (2) (C); 195,3 (C).

HPLC: Columna C₁₈ *t*_R: 11,64 min.

 Columna C₈ *t*_R: 10,18 min.

 Columna fenólica *t*_R: 11,30 min.

Obtención de 1-metoxi-2-nitro-4-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]benceno (24).



Siguiendo el método B, a una suspensión de 465 mg (1,15 mmol) de ioduro de metiltrifenilfosfonio en 7 mL de THF seco, se añaden 0,58 mL (0,92 mmol) de *n*BuLi (1,6 M en hexano) y 200 mg (0,58 mmol) de **22**. Después de 6 horas, el crudo de reacción, 599 mg, se purifican por cromatografía de columna en gel de sílice (Hex/AcOEt 75/25) y se obtienen 116 mg (58%) del producto **24**.

1-metoxi-2-nitro-4-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]benceno (24):

IR (película): 1531, 1277, 1127, 1012, 903, 838 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. VIIa) 3,79 (6H, s, OCH_3); 3,85 (3H, s, OCH_3); 3,95 (3H, s, OCH_3); 5,41 (2H, s, $\text{C}=\text{CH}_2$); 6,48 (2H, s, H_2 , H_6); 7,04 (1H, d; $J=8,6$, H_5); 7,50 (1H, dd; $J=8,6$; 2,4, H_6); 7,83 (1H d; $J=2,4$, H_2).

RMN ^{13}C : (Fig. VIIb) 56,2 (2) (CH_3); 56,6 (CH_3); 60,9 (CH_3); 105,5 (2) (CH); 113,3 (CH); 114,7 (CH_2); 125,1 (CH); 133,8 (CH); 133,8 (C); 136,2 (C); 139,3 (C); 147,1 (C); 147,6 (C); 152,5 (C); 153,1 (2) (C).

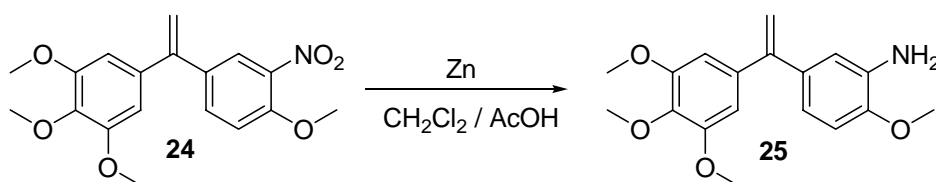
EM: 345 (M^+).

HPLC: Columna C_{18} t_R : 15,67 min.

Columna C_8 t_R : 14,38 min.

Columna fenólica t_R : 15,11 min.

Obtención de 2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]anilina (25).



A una disolución de 85 mg (0,25 mmol) de **24** en 2 mL de CH_2Cl_2 , bajo atmósfera de argón, se añaden 10 mL de ácido acético glacial y 129 mg (1,97 mmol) de Zn. Después de 14 horas, se filtra a través de celita, se evapora el disolvente y se obtienen 76 mg (96%) del producto reducido **25**.

2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]anilina (25):

IR (película): 3370, 1581, 1232, 1125, 1023, 846 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. VIIIa) 3,82 (6H, s, OCH_3); 3,87 (6H, s, OCH_3); 5,27 (1H, d; $J=1,2$, $\text{C}=\text{CH}_2$); 5,34 (1H, d; $J=1,2$, $\text{C}=\text{CH}_2$); 6,56 (2H, s, H_2 , H_6); 6,74 (3H, s, H_2 , H_5 , H_6).

RMN ^{13}C : (Fig. VIIIb) 55,6 (CH_3); 56,2 (2) (CH_3); 61,0 (CH_3); 105,7 (2) (CH); 109,9 (CH); 112,4 (CH_2); 115,3 (CH); 119,0 (CH); 134,1 (C); 135,4 (C); 137,6 (C); 137,8 (C); 147,5 (C); 150,0 (C); 152,8 (2) (C).

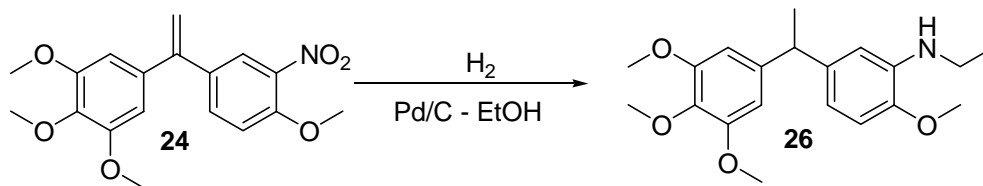
EM: 315 (M^+).

HPLC: Columna C_{18} t_R : 13,71 min.

Columna C_8 t_R : 12,48 min.

Columna fenólica t_R : 13,65 min.

Obtención de *N*-etil-2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]anilina (26).



Seguendo el método F, 11 mg (0,03 mmol) de **24**, 5 mg de Paladio sobre Carbono y 10 mL de EtOH, en atmósfera de H₂, reaccionan para dar 8 mg (73%) de **26**.

***N*-etil-2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]anilina (26):**

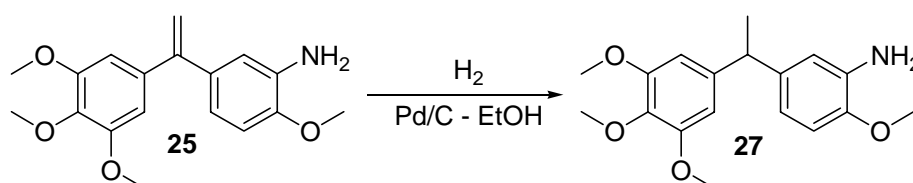
IR (película): 3414, 1591, 1513, 1228, 1126 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. IXa) 1,26 (3H, t; *J*=7,2, CH₂CH₃); 1,59 (3H, d; *J*=7,2, CHCH₃); 3,12 (2H, c; *J*=7,2, CH₂CH₃); 3,83 (12H, s, OCH₃); 3,99 (1H, q, *J*=7,2, CHCH₃); 6,45 (1H, d, *J*=8,2, H₄); 6,46 (2H, s, H₂, H₆); 6,53 (1H, d; *J*=2, H₆); 6,68 (1H, d; *J*=8,2, H₃).

RMN ¹³C: (Fig. IXb) 14,8 (CH₃); 22,4 (CH₃); 38,2 (CH₂); 44,9 (CH); 55,5 (CH₃); 56,1 (2) (CH₃); 60,9 (CH₃); 104,6 (2) (CH); 109,1 (CH); 109,6 (CH); 114,5 (C); 114,8 (CH); 117,2 (C); 138,2 (C); 139,1 (C); 142,8 (C); 153,0 (2) (C).

EM: 345 (M⁺).

Obtención de 2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]anilina (27).



Seguendo el método F, a una disolución de 29 mg (0,09 mmol) de **25** en 20 mL de EtOH, bajo atmósfera de H₂, se añaden 8 mg de Pd/C. Veinticuatro horas después, se obtienen 23 mg (79%) del producto hidrogenado **27**.

2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]anilina (27):

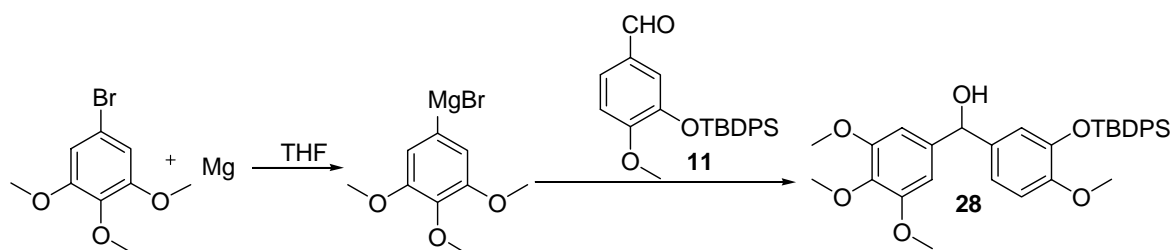
IR (película): 3370, 1588, 1125 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. Xa) 1,56 (3H, d; $J=7,2$, CHCH_3); 3,81 (12H, s, OCH_3); 3,83 (1H, m, CHCH_3); 6,43 (2H, s, H_2, H_6); 6,56 (1H d; $J=2,2$, H_6); 6,62 (1H, dd, $J=8,2; 2,2$ H_4); 6,71 (1H, d; $J=8,2$, H_3).

RMN ^{13}C : (Fig. Xb) 22,2 (CH_3); 44,4 (CH); 55,6 (CH_3); 56,1 (2) (CH_3); 60,9 (CH_3); 104,6 (2) (CH); 110,3 (CH); 114,6 (CH); 117,2 (CH); 135,2 (C); 135,9 (C) 139,1 (C); 142,6 (C); 149,3 (C); 153,0 (2) (C).

EM: 317 (M^+).

Obtención de (3-*terc*butildifenilsiloxi-4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil) metanol (28).



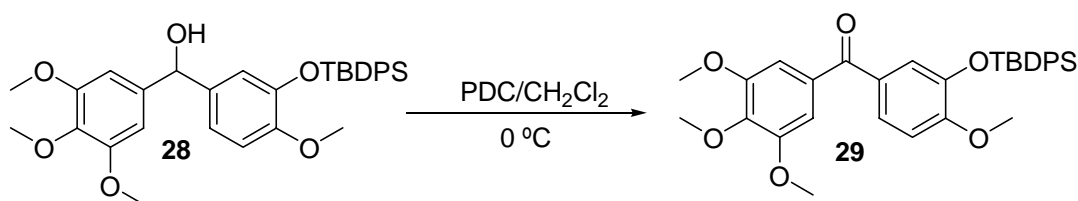
Seguindo el método C2, a una suspensión de 304 mg (12,15 mmol) de magnesio en 2,5 mL de THF seco, se añaden 2,00 g (8,1 mmol) de 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno y 5 mg de yodo. A continuación, la suspensión blanquecina se añade sobre 1,00 g (2,56 mmol) de **11** disuelto en 3 mL de THF a 0 °C. Después de 1 hora, se obtienen 2,93 g de bruto de reacción que se purifican por percolación en columna de sílice (Hex-AcOEt 1:1) y se obtienen 1,34 g (94%) del producto **28**.

(3-tercbutildifenilsiloxi-4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (28):

RMN ¹H: (Fig. XIa) 1,09 (9H, s, C(CH₃)₃); 3,60 (3H, s, OCH₃); 3,74 (6H, s, OCH₃); 3,82 (3H, s, OCH₃); 5,49 (1H, d, *J*=3,6, CHOH); 6,41 (2H, s, H₂, H₆); 6,66 (1H d, *J*=2,2, H₂); 6,74 (1H, d; *J*=8,2 H₅); 6,85 (1H, d; *J*=8,6; 2,2, H₆); 7,30 (6H, m); 7,66 (4H, m).

RMN ¹³C: (Fig. XIb) 14,2 (C); 26,7 (3) (CH₃); 55,4 (CH₃); 55,8 (2) (CH₃) 60,8 (CH₃); 75,5 (CH); 103,2 (2) (CH); 118,8 (CH); 119,8 (CH); 122,1 (CH); 127,5 (4) (CH); 129,7 (2) (CH); 133,5 (2) (C); 135,4 (4) (CH); 136,6 (C); 140,0 (C); 144,9 (C); 150,0 (C); 152,9 (2) (C); 153,4 (C).

Obtención de (3-tercbutildifenilsiloxi-4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil) metanona (29).



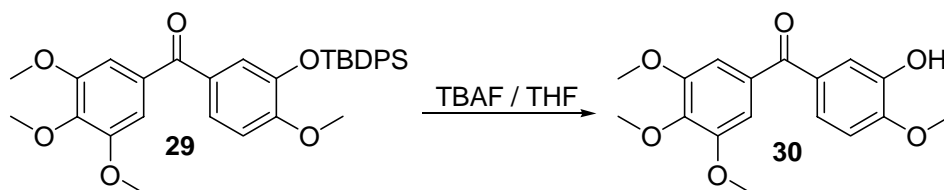
Seguendo el método D2, a una solución de 1,34 g (2,39 mmol) de **28** en 40 mL de CH₂Cl₂ seco a 0 °C, se añaden 1,20 g (3,11 mmol) de PDC. Después de 24 horas, se obtienen 1,12 g (85%) de bruto de reacción, que se utilizan en el siguiente paso sin purificación previa.

(3-tercbutildifenilsiloxi-4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (29):

RMN ¹H: (Fig. XIIa) 1,12 (9H, s, C(CH₃)₃); 3,60 (3H, s, OCH₃); 3,77 (6H, s, OCH₃); 3,92 (3H, s, OCH₃); 6,79 (1H, d; *J*=8,2, H₅); 6,85 (2H, s, H₂, H₆); 7,23 (1H d; *J*=2,2, H₂); 7,28-7,36 (6H, m); 7,40 *J*=8,6; 2,2, H₆); 7,66 (4H, m).

RMN ¹³C: (Fig. XIIb) 19,8 (C); 26,7 (3) (CH₃); 55,2 (CH₃); 56,0 (2) (CH₃) 60,9 (CH₃); 107,1 (2) (CH); 111,1 (CH); 121,9 (CH); 125,0 (CH); 127,6 (4) (CH); 129,8 (2) (CH); 129,9 (C); 133,1 (2) (C); 135,3 (4) (CH); 137,6 (C); 141,3 (C); 144,5 (C); 152,7 (2) (C); 154,5 (C); 194,4 (C).

Síntesis de (3-hidroxi-4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (30).



A una disolución de 354 mg (0,64 mmol) de **29** en 10 mL de THF, se añaden 1,00 mL (1,00 mmol) de TBAF (1,0 M en THF). Después de 24 horas en agitación bajo atmósfera de argón, se vierte sobre agua y se extrae con éter 3 veces. El conjunto de las fases orgánicas se lava con disolución acuosa saturada de NaCl, se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El crudo de reacción obtenido (356 mg) se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex-AcOEt 8:2) para dar 85 mg (42%) del producto **30**.

(3-hidroxi-4-metoxifenil)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (30):

IR (película): 3409, 1645, 1454, 1278, 1009, 763 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XIIIa) 3,84 (6H, s, OCH₃); 3,90 (3H, s, OCH₃); 3,93 (3H, s, OCH₃); 6,89 (1H, d; *J*=8,2, H₅); 7,00 (2H, s, H₂, H_{6'}); 7,35 (1H, dd; *J*=8,2; 2,2, H₆); 7,41 (1H d; *J*=2,2, H₂).

RMN ¹³C: (Fig. XIIIb) 56,1 (CH₃); 56,3 (2) (CH₃) 61,0 (CH₃); 107,5 (2) (CH); 109,8 (CH); 116,3 (CH); 123,7 (CH); 130,9 (C); 133,2 (C); 141,6 (C); 145,5 (2) (C); 150,4 (C); 152,8 (C); 194,8 (C).

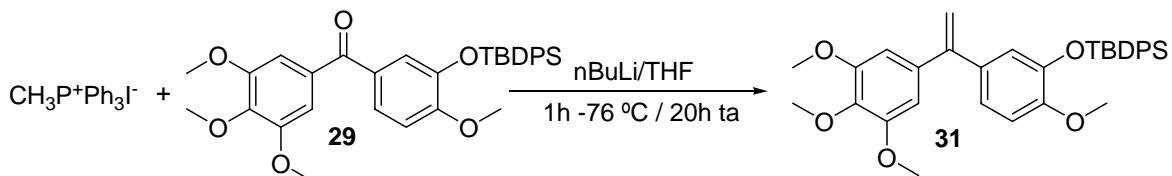
EM: 318 (M⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 10,88 min.

Columna C₈ t_R: 10,04 min.

Columna fenólica t_R: 10,83 min.

Obtención de *terc*butil-{2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]fenoxi} difenilsilano (**31**).



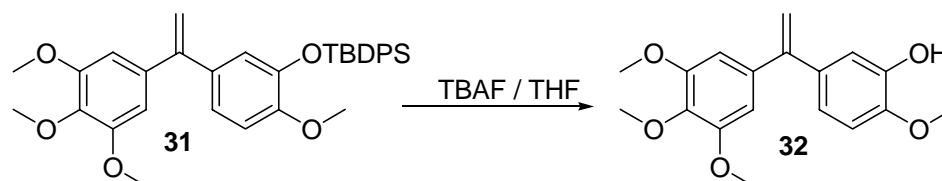
Siguiendo el método B, a una suspensión de 653 mg (1,62 mmol) de ioduro de metiltrifenilfosfonio en 7 mL de THF seco, se añaden 0,84 mL (1,35 mmol) de *n*BuLi (1,6 M en hexano) y 310 mg (0,56 mmol) de **29**. Después de 6 horas, el crudo de reacción obtenido, 864 mg se purifica por cromatografía de columna en geñ de sílice (Hex-AcOEt 9:1) para dar 177 mg (57%) del producto **31**.

*terc*butil-{2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]fenoxi} difenilsilano (**31**):

RMN ¹H: (Fig. XIVa) 1,14 (9H, s, tBu); 3,62 (3H, s, OCH₃); 3,74 (6H, s, OCH₃); 3,89 (3H, s, OCH₃); 5,10 (1H, d; *J*=1,4, CH₂); 5,15 (1H, d; *J*=1,4, CH₂); 6,42 (2H, s, H₂, H₆); 6,72 (1H, d; *J*=1,8, H₆); 6,73 (1H, d; *J*=8,2, H₃); 6,85 (1H dd; *J*=8,2; 1,8, H₄); 7,35 (6H, m); 7,70 (4H, m).

RMN ¹³C: (Fig. XIVb) 19,8 (C); 26,8 (3) (CH₃); 55,5 (CH₃); 56,0 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 105,5 (2) (CH); 111,7 (CH); 112,4 (CH₂); 120,2 (CH); 121,4 (CH); 127,5 (4) (CH); 129,7 (2) (CH); 133,5 (2) (C); 133,7 (2) (C); 135,6 (4) (CH); 137,5 (C); 144,7 (C); 149,5 (C); 150,5 (C); 152,7 (2) (C).

Obtención de 2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]fenol (**32**).



A una disolución de 86 mg (0,16 mmol) de **31** en 4 mL de THF, se añaden 0,50 mL (0,50 mmol) de TBAF (1,0 M en THF). Después de 8 horas, en agitación bajo atmósfera de argón se vierte sobre agua y se extrae con éter 3 veces. El conjunto de las fases orgánicas se lava con disolución acuosa saturada de NaCl, se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad para obtener 66 mg de crudo de reacción. Tras cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando como eluyente Hex/AcOEt 8/2, se obtienen 25 mg (50%) del producto desprotegido **32** y 20 mg de la cetona **30** (39%).

2-metoxi-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]fenol (32):

IR (película): 3415, 1580, 1252, 1125, 1024 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. XVa) 3,81 (6H, s, OCH_3); 3,87 (3H, s, OCH_3); 3,90 (3H, s, OCH_3); 5,30 (1H, d; $J=1,4$, CH_2); 5,37 (1H, d; $J=1,4$, CH_2); 6,55 (2H, s, H_2 , H_6); 6,80 (1H, d; $J=8,2$, H_3); 6,85 (1H, dd; $J=8,2$; 1,8, H_4); 6,97 (1H d; $J=1,8$, H_5).

RMN ^{13}C : (Fig. XVb) 56,0 (3) (CH_3); 61,0 (CH_3); 105,7 (2) (CH); 110,2 (CH); 113,0 (CH_2); 114,5 (CH); 120,0 (CH); 127,7 (C); 134,7 (C); 137,5 (C); 145,2 (C); 146,5 (C); 149,6 (C); 152,8 (2) (C).

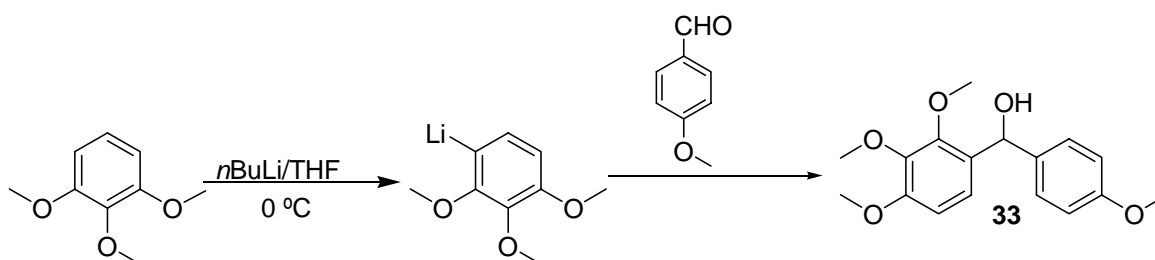
EM: 316 (M^+).

HPLC: Columna C_{18} t_R : 14,17 min.

Columna C_8 t_R : 12,94 min.

Columna fenólica t_R : 13,24 min.

Obtención de (4-metoxifenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanol (33).



Seguendo el método C3, a una solución de 2,00 g (11,9 mmol) de trimetoxibenceno en 10 mL de THF seco a $0\text{ }^\circ\text{C}$, se añaden 7,44 mL (11,9 mmol) de $n\text{Buli}$ (1,6 M en hexano). Se mantiene en agitación 1 hora y se añaden 1,62 g (11,9 mmol) de *p*-anisaldehído. Después de 13 horas, se obtienen 3,62 g de crudo de reacción que se utilizan en el siguiente paso sin purificación previa.

(4-metoxifenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanol (33):

IR (película): 3472, 1602, 1248, 1096, 807 cm^{-1} .

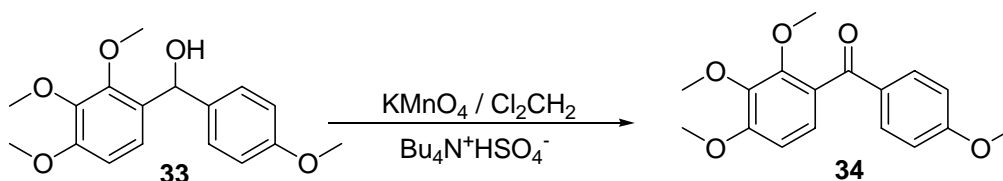
RMN ^1H : (Fig. XVIa) 3,67 (3H, s, OCH_3); 3,80 (3H, s, OCH_3); 3,85 (6H, s, OCH_3); 5,89 (1H, d; $J=5$, CHOH); 6,64 (1H, d; $J=8,6$, H_5^*); 6,86 (2H, d; $J=8,6$, H_3 , H_5); 6,97 (1H, d; $J=8,6$, H_6^*); 7,28 (2H, d; $J=8,6$, H_2 , H_6).

* Asignación intercambiable.

RMN ^{13}C : (Fig. XVIb) 55,2 (CH_3); 56,0 (CH_3); 60,4 (CH_3); 60,7 (CH_3); 71,6 (CH); 107,0 (CH); 113,6 (2) (CH); 122,0 (CH); 127,7 (2) (CH); 130,2 (C); 136,4 (C); 142,1 (C); 151,1 (C); 153,2 (C); 158,7 (C).

EM: 304 (M^+).

Obtención de (4-metoxifenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanona (34).



Siguiendo el método D2, a una solución de 3,62 g (11,9 mmol) de **33** en 50 mL de CH_2Cl_2 se añaden 3,76 g (24,0 mmol) de KMnO_4 , 20 mg de $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{HSO}_4^-$ y 1 mL de H_2O . Después de 24 horas, se obtienen 3,00 g que se purifican por cromatografía de columna (Hex/AcOEt 8/2) para obtener 604 mg (2,00 mmol, 17%) de **34** y 1,38 g (38%) del material de partida **33** sin reaccionar.

(4-metoxifenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanona (34).

IR (película): 1651, 1596, 1025, 850, 806 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. XVIIa) 3,65 (3H, s, OCH_3); 3,71 (3H, s, OCH_3); 3,77 (6H, s, OCH_3); 6,60 (1H, d; $J=8,6$, H_5^*); 6,79 (2H, d; $J=9$, H_3 , H_5); 6,94 (1H, d; $J=8,6$, H_6^*); 7,67 (2H, d; $J=9$, H_2 , H_6);

* Asignación intercambiable

RMN ^{13}C : (Fig. XVIIb) 55,4 (CH_3); 56,0 (CH_3); 60,8 (CH_3); 61,7 (CH_3); 106,8 (CH); 113,4 (2) (CH); 124,5 (CH); 126,7 (C); 130,9 (C); 132,2 (2) (CH) 142,0 (C); 152,2 (C); 155,7 (C); 163,4 (C); 193,9 (C).

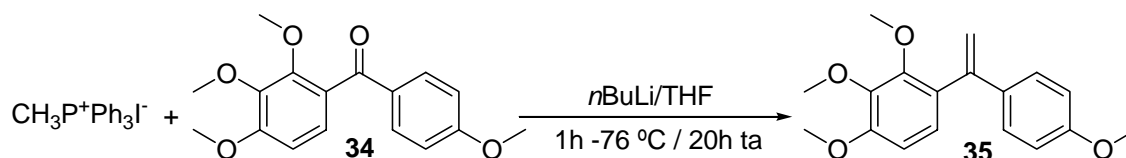
EM: 302 (M^+).

HPLC: Columna C_{18} t_R : 13,63 min.

Columna C_8 t_R : 12,80 min.

Columna fenólica t_R : 13,29 min.

Obtención de 1,2,3-trimetoxi-4-[1-(4-metoxifenil)vinil]benceno (35).



Seguendo el método B, a una suspensión de 731 mg (1,80 mmol) de ioduro de metiltrifenilfosfonio en 7 mL de THF seco, se añaden 0,85 mL (1,36 mmol) de n -Buli (1,6 M en hexano) y 137 mg (0,45 mmol) de **34**. Después de 20 horas, se obtienen 834 mg que se purifican por cromatografía de columna de gel de sílice (Hex-AcOEt 9:1) para dar 27 mg (20%) del producto metilénico **35**.

1,2,3-trimetoxi-4-[1-(4-metoxifenil)vinil]benceno (35):

IR (película): 1602, 1500, 1288, 1098, 1026, 895, 838 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. XVIIIa) 3,55 (3H, s, OCH_3); 3,80 (3H, s, OCH_3); 3,86 (3H, s, OCH_3); 3,89 (3H, s, OCH_3); 5,18 (1H, d; $J=1,4$, CH_2); 5,54 (1H, d; $J=1,4$, CH_2); 6,67 (1H, d; $J=8,6$, H_5^*); 6,83 (2H, d; $J=9$, H_3 , H_5); 6,95 (1H, d; $J=8,6$, H_6^*); 7,25 (2H, d; $J=8,6$, H_2 , H_6).

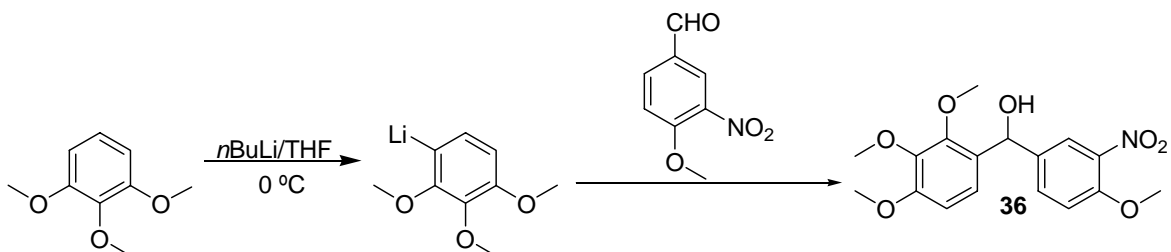
* Asignación intercambiable.

RMN ^{13}C : (Fig. XVIIIb) 55,3 (CH_3); 56,0 (CH_3); 60,7 (CH_3); 60,9 (CH_3); 106,9 (CH); 113,5 (2) (CH); 113,7 (CH_2); 125,2 (CH); 127,8 (2) (CH); 129,4 (C); 134,5 (C); 142,1 (C); 146,3 (C); 151,7 (C); 153,5 (C); 159,2 (C).

EM: 300 (M^+).

HPLC: Columna C_{18}	t_R : 17,21 min.
Columna C_8	t_R : 15,48 min.
Columna fenólica	t_R : 15,55 min.

Obtención de (4-metoxi-3-nitrofenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanol (36).



Siguiendo el método C3, a una solución de 2,00 g (11,9 mmol) de trimetoxibenceno en 10 mL de THF seco a 0 °C, se añaden 7,2 mL (11,5 mmol) de *n*-Buli (1,6 M en hexano). Se mantiene en agitación 1 hora y se añaden 2,08 g (11,5 mmol) de 4-metoxi-3-nitrobenzaldehído. Después de 12 horas, se obtienen 2,53 g que se purifican por percolación en columna de gel de sílice (Hex/ AcOEt 9/1) para dar 1,27 g (32%) del alcohol **36**.

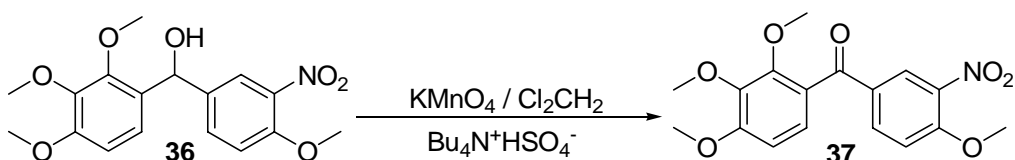
(4-metoxi-3-nitrofenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanol (36):

RMN ¹H: (Fig. XIXa) 3,73 (3H, s, OCH₃); 3,85 (3H, s, OCH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃); 3,95 (3H, s, OCH₃); 5,88 (1H, d, *J*=6,2, CHOH); 6,65 (1H, d; *J*=8,4, H₅^{*}); 6,93 (1H, d; *J*=8,4, H₆^{*}); 7,04 (1H, d; *J*=8,2, H₅); 7,55 (1H, dd; *J*=8,6; 2,2, H₆); 7,87 (1H d; *J*= 2,2, H₂).

* Asignación intercambiable.

RMN ¹³C: (Fig. XIXb) 56,1 (CH₃); 56,6 (CH₃); 60,7 (CH₃); 60,8 (CH₃); 70,4 (CHOH); 107,2 (CH); 113,2 (CH); 121,8 (CH); 123,9 (CH); 129,0 (C); 132,3 (CH); 137,0 (C); 139,1 (C); 142,0 (C); 150,9 (C); 151,8 (C); 153,6 (C).

Obtención de (4-metoxi-3-nitrofenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanona (37).



Seguindo el método D2, a una solución de 567 mg (1,62 mmol) de **36** en 30 mL de CH₂Cl₂, se añaden 1,28 g (8,12 mmol) de KMnO₄, 20 mg de Bu₄N⁺H₄SO₄⁻ y 1 mL de H₂O. Después de 24 horas, se obtienen 220 mg (39%) que se utilizan sin purificación previa en el siguiente paso.

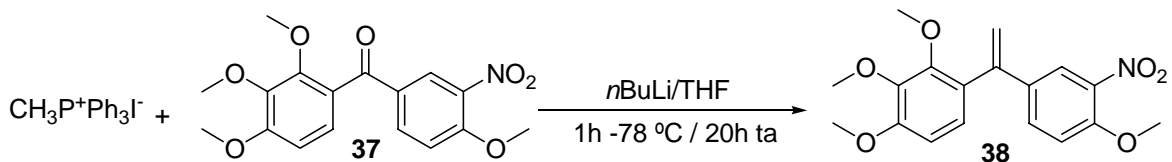
(4-metoxi-3-nitrofenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanona (37):

RMN ¹H: (Fig. XXa) 3,71 (3H, s, OCH₃); 3,84 (3H, s, OCH₃); 3,90 (3H, s, OCH₃); 4,00 (3H, s, OCH₃); 6,72 (1H, d; *J*=8,6, H₅^{*}); 7,10 (1H, d; *J*=8,6, H₆^{*}); 7,12 (1H, d; *J*=8,6, H₅); 8,00 (1H, dd; *J*=8,6; 2,2, H₆); 8,21 (1H d; *J*= 2,2, H₂).

* Asignación intercambiable.

RMN ¹³C: (Fig. XXb) 56,2 (CH₃); 56,9 (CH₃); 61,1 (CH₃); 61,9 (CH₃); 107,2 (CH); 113,1 (CH); 125,2 (CH); 127,6 (CH); 130,6 (C); 135,6 (CH); 139,0 (C); 142,0 (C); 151,0 (C); 152,5 (C); 156,0 (C); 156,8 (C); 192,2 (C).

Obtención de 1-metoxi-2-nitro-4-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]benceno (38).



Seguendo el método B, a una suspensión de 1,02 g (2,54 mmol) de ioduro de metiltrifenilfosfonio en 10 mL de THF seco, se añaden 1,38 mL (2,22 mmol) de $n\text{BuLi}$ (1,6 M en hexano) y 220 mg (0,63 mmol) de **37**. Después de 6 horas, el crudo de reacción obtenido, 1,31 g, se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice (Hex/AcOEt 9/1) para dar 58 mg (27%) del producto **38**.

1-metoxi-2-nitro-4-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]benceno (38):

IR (película): 1598, 1531, 1279, 1095, 1091, 897, 813 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. XXIa) 3,55 (3H, s, OCH_3); 3,84 (3H, s, OCH_3); 3,89 (3H, s, OCH_3); 3,94 (3H, s, OCH_3); 5,30 (1H, s, CH_2); 5,58 (1H, s, CH_2); 6,68 (1H, d; $J=8,4$, H_5 *); 6,94 (1H, d; $J=8,4$, H_6 *); 7,00 (1H, d; $J=8,8$, H_6); 7,47 (1H, dd; $J=8,8$; 2,2, H_5); 7,78 (1H d; $J=2,2$, H_3).

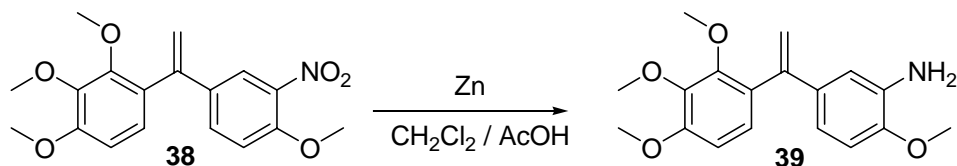
* Asignación intercambiable

RMN ^{13}C : (Fig. XXIb) 56,1 (CH_3); 56,6 (CH_3); 60,7 (CH_3); 61,0 (CH_3); 107,2 (CH); 113,1 (CH); 115,9 (CH_2); 123,5 (CH); 125,2 (CH); 127,7 (C); 132,1 (CH); 134,6 (C); 139,3 (C); 142,4 (C); 144,6 (C); 151,5 (C); 152,2 (C); 154,1 (C).

EM: 345 (M^+).

HPLC: Columna C_{18} t_R : 15,80 min.
 Columna C_8 t_R : 14,59 min.
 Columna fenólica t_R : 15,14 min.

Obtención de 2-metoxi-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]anilina (39).



A una disolución de 57 mg (0,17 mmol) de **38** en 2 mL de CH₂Cl₂ se añaden 10 mL de ácido acético glacial y 100 mg (1,54 mmol) de Zn. Después de 18 horas, se filtra a través de celita, se evapora el disolvente y se obtienen 52 mg (97%) del producto de reducción **39**.

2-metoxi-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]anilina (39):

IR (película): 3367, 1596, 1227, 892, 807 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XXIIa) 3,56 (3H, s, OCH₃); 3,82 (3H, s, OCH₃); 3,85 (3H, s, OCH₃); 3,87 (3H, s, OCH₃); 5,15 (1H, s, CH₂); 5,51 (1H, s, CH₂); 6,66 (4H, m); 6,92 (1H, d; *J*=8,2).

RMN ¹³C: (Fig. XXIIb) 55,6 (CH₃); 56,0 (CH₃); 60,8 (CH₃); 60,9 (CH₃); 106,8 (CH); 109,9 (CH); 113,7 (CH₂); 114,2 (CH); 118,0 (CH); 125,3 (CH); 129,5 (C); 134,8 (C); 142,3 (C); 146,5 (2) (C); 147,5 (C); 151,7 (C); 153,4 (C).

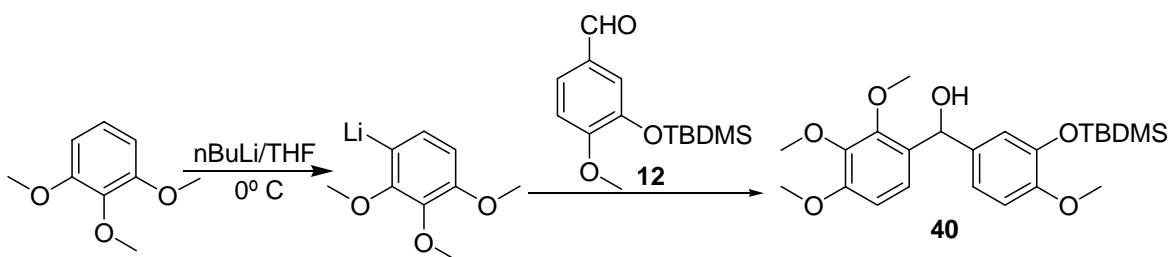
EM: 315 (M⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,17 min.

 Columna C₈ t_R: 12,83 min.

 Columna fenólica t_R: 13,41 min.

Obtención de (3-*terc*butildimeltisiloxi-4-metoxifenil)(2,3,4-trimetoxifenil) metanol (40).



Seguindo el método C3, a una solución de 5,50 g (32,7 mmol) de trimetoxibenceno en 20 mL de THF seco a 0 °C, se añaden 18,75 mL (30,00 mmol) de *n*BuLi (1,6 M en hexano). Se mantiene en agitación 1 hora y se añaden 2,88 g (10,1 mmol) de **12**. Después de 12 horas, se obtienen 7,54 g que se purifican por percolación en columna de sílice (Hex/AcOEt 9/1), aislándose 3,22 g (69%) de alcohol **40**.

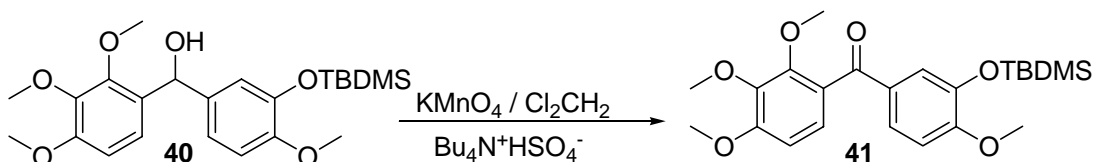
(3-*terc*butildimeltisiloxi-4-metoxifenil)(2,3,4-trimetoxifenil)metanol (40):

RMN ¹H: (Fig. XXIIIa) 0,12 (6H, s, SiCH₃); 0,97 (9H, s, *t*Bu); 3,65 (3H, s, OCH₃); 3,78 (3H, s, OCH₃); 3,85 (3H, s, OCH₃); 3,87 (3H, s, OCH₃); 5,82 (1H, d; *J*=6,2, CHOH); 6,64 (1H, d; *J*=8,6, H₅^{*}); 6,79 (1H d; *J*= 8,6, H₅); 6,86 (1H, dd; *J*=8,6; 2,2, H₆); 6,88 (1H, d; *J*= 2,2, H₂); 6,94 (1H, d; *J*=8,6, H₆^{*}).

* Asignación intercambiable.

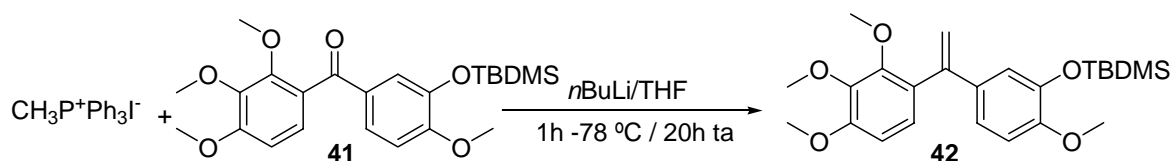
RMN ¹³C: (Fig. XXIIIb) -4,6 (2) (CH₃); 18,5 (C); 25,8 (3) (CH₃); 55,5 (CH₃); 56,0 (CH₃); 60,7 (2) (CH₃); 106,9 (CH); 111,7 (CH); 119,5 (CH); 119,7 (CH); 122,1 (CH); 129,2 (C); 130,3 (C); 137,0 (C); 144,7 (C); 150,1 (C); 151,5 (C); 153,2 (C).

Obtención de (3-*terc*butildimeltisiloxi-4-metoxifenil)(2,3,4-trimetoxifenil) metanona (41).



Seguindo el método D2, a una solución de 2,02 g (4,65 mmol) de **40** en 100 mL de CH₂Cl₂, se añaden 3,50 g (22,15 mmol) de KMnO₄, 100 mg de Bu₄N⁺H₄SO₄⁻ y 2 mL de H₂O. Después de 24 horas, se obtienen 1,85 g (4,28 mmol, 92%) de una mezcla de producto de oxidación **41** y de material de partida **39**, que se utilizan sin purificación previa en el siguiente paso. RMN ¹H del crudo de reacción: Figura XXIVa.

Obtención de *terc*butil{2-metoxi-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]fenoxi} dimetilsilano (**42**).



Seguindo el método B, a una suspensión de 3,70 g (9,20 mmol) de ioduro de metiltrifenilfosfonio en 40 mL de THF seco, se añaden 4,31 mL (6,90 mmol) de *n*-Buli (1,6 M en hexano) y 1,00 g (2,31 mmol) de **41**. Después de 16 horas, se obtienen 4,41 g que se purifican por cromatografía de columna (Hex-AcOEt 9:1) para dar 80 mg (8%) de **42** y 370 mg (37%) de **40**, sin reaccionar.

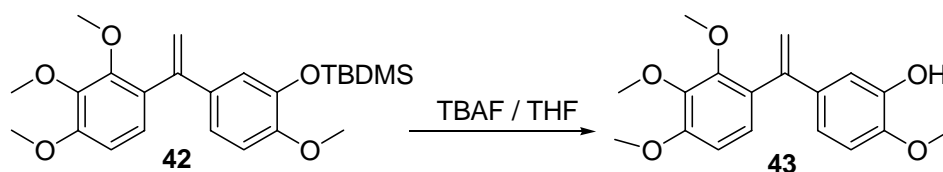
*terc*butil{2-metoxi-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]fenoxi} dimetilsilano (**42**):

RMN ¹H: (Fig. XXVa) 0,13 (6H, s, SiCH₃); 0,98 (9H, s, *t*Bu); 3,54 (3H, s, OCH₃); 3,79 (3H, s, OCH₃); 3,85 (3H, s, OCH₃); 3,89 (3H, s, OCH₃); 5,17 (1H, d; *J*=1,4, CH₂); 5,51 (1H, d; *J*=1,4, CH₂); 6,67 (1H, d; *J*=8,6, H₅^{*}); 6,73 (1H, d; *J*=8,6, H₆^{*}); 6,80 (1H, dd; *J*=8,6; 2,2, H₄); 6,89 (1H, d; *J*= 2,2, H₆); 6,93 (1H, d; *J*= 8,6, H₃).

* Asignación intercambiable

RMN ¹³C: (Fig. XXVb) -4,52 (2) (CH₃); 18,5 (C); 25,8 (3) (CH₃); 55,5 (CH₃); 56,0 (CH₃); 60,7 (CH₃); 60,8 (CH₃); 106,9 (CH); 111,4 (CH); 113,7 (CH₂); 119,4 (CH); 120,3 (CH); 125,2 (CH); 132,2 (C); 134,9 (C); 142,3 (C); 144,6 (C); 146,4 (C); 150,6 (C); 151,6 (C); 153,5 (C).

Obtención de 2-metoxi-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]fenol (**43**).



A una disolución de 80 mg (0,19 mmol) de **42** en 2 mL de THF, se añaden 0,56 mL (0,56 mmol) de TBAF (1,0 M en THF). Después de 1 hora en agitación bajo atmósfera de argón, se vierte sobre agua y se extrae con éter 3 veces. El conjunto de las fases orgánicas se lava con disolución acuosa saturada de NaCl, se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad para obtener 57 mg (95%) del producto desprotegido **43**.

2-metoxi-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]fenol (43):

IR (película): 3415, 1593, 1266, 1095, 1024 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. XXVIa) 3,57 (3H, s, OCH_3); 3,85 (3H, s, OCH_3); 3,86 (3H, s, OCH_3); 3,88 (3H, s, OCH_3); 5,18 (1H, d; $J=1,6$, CH_2); 5,55 (1H, d; $J=1,6$, CH_2); 6,66 (1H, d; $J=8,6$); 6,76 (2H, d; $J=1,4$); 6,92 (2H, d; $J=8,2$).

RMN ^{13}C : (Fig. XXVIb) 56,0 (CH_3); 56,1 (CH_3); 60,8 (CH_3); 60,9 (CH_3); 107,0 (CH); 110,1 (CH); 113,0 (CH); 114,1 (CH_2); 118,7 (CH); 125,2 (CH); 129,2 (C); 135,4 (C); 142,3 (C); 145,2 (2) (C); 146,2 (2) (C); 153,5 (C).

EM: 316 (M^+).

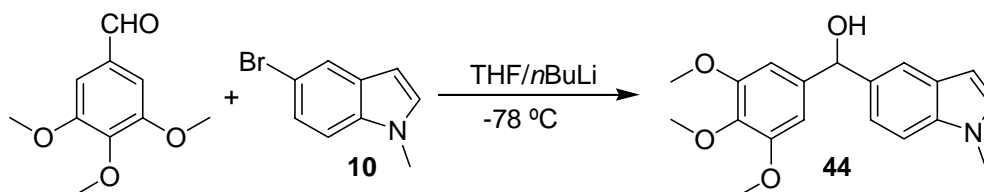
HPLC: Columna C_{18} t_{R} : 14,22 min.

Columna C_8 t_{R} : 12,80 min.

Columna fenólica t_{R} : 13,04 min.

IV.3.C. Síntesis de fenstatinas e isocombretastatinas con un resto indolilo.

Obtención de (1-metil-1*H*-indol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (**44**).



Según el método C1, a una disolución de 5,30 g (25,2 mmol) de 5-bromo-N-metil-1*H*-indol en 40 mL de THF seco, se añaden 34,7 mL (55,2 mmol) de *n*BuLi (1,6 M en hexano) y 6,50 g (33,5 mmol) de 3,4,5-trimetoxibenzaldehído. Tras 24 horas de reacción, se obtienen 6,50 g (79%) de producto bruto, el cual se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: AcOEt) para dar 4 g (50%) del compuesto **44**.

(1-metil-1*H*-indol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (**44**):

P. f.: 125-127 °C. (Cl₂CH₂/Hex).

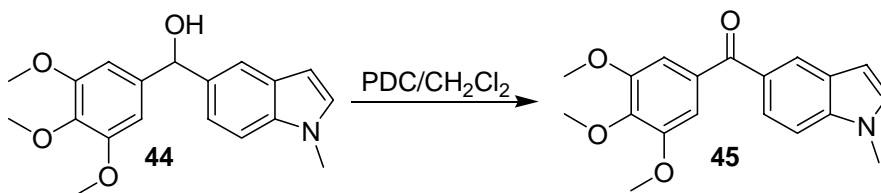
IR (pastilla de KBr): 3386, 1591, 1125, 734 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XXVIIa) 3,77 (3H, s, NCH₃); 3,81 (6H, s, OCH₃); 3,83 (3H, s, OCH₃); 5,88 (1H, s, CHOH); 6,47 (1H, d, *J*= 3,3, H₃); 6,67 (2H, s, H₂, H₆); 7,06 (1H, d, *J*=3,3, H₂); 7,22 (1H, dd, *J*=8,6; 1,8, H₆); 7,29 (1H, d, *J*=8,6, H₇); 7,62 (1H, d, *J*=1,8, H₄).

RMN ¹³C: (Fig. XXVIIb) 32,9 (NCH₃); 56,1 (2) (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 76,9 (CHOH); 101,2 (CH); 103,4 (2) (CH); 109,5 (CH); 119,2 (CH); 120,7 (CH); 128,4 (C); 129,5 (CH); 135,1 (C); 136,4 (C); 136,9 (C); 140,4 (C); 153,2 (2) (C).

EM: 311 (M⁺).

Obtención de (1-metil-1*H*-indol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (**45**):



Según el método D1, a una disolución de 2,97 g (9,1 mmol) de **44** en 50 mL de CH₂Cl₂, se añaden 5,12 g (13,6 mmol) de PDC. Tras 24 horas a temperatura ambiente, se obtienen 3,3 g de crudo de reacción, que se purifican mediante cromatografía de columna usando como eluyente Hex/AcOEt 7/3 para dar 1,92 g (65%) del compuesto **45**.

(1-metil-1*H*-indol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (**45**):

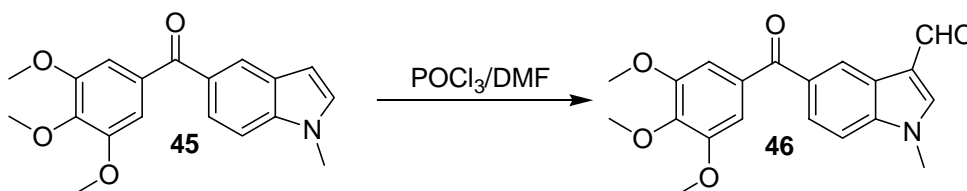
IR (película): 1649, 1582, 820, 761 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XXVIIIa) 3,75 (3H, s, N-CH₃); 3,81 (6H, s, OCH₃); 3,90 (3H, s, OCH₃); 6,53 (1H, d, *J*= 3,3, H₃); 7,04 (2H, s, H₂, H₆); 7,08 (1H, d, *J*=3,3, H₂); 7,32 (1H, d, *J*=8,8, H₇); 7,74 (1H, dd, *J*=8,8; 1,8, H₆); 8,09 (1H, d, *J*=1,8, H₄).

RMN ¹³C: (Fig. XXVIIIb) 33,1 (NCH₃); 56,4 (2) (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 103,0 (CH); 107,8 (2) (CH); 109,1 (CH); 123,8 (CH); 125,2 (CH); 127,7 (C); 129,3 (C); 130,5 (CH); 134,3 (C); 138,9 (C); 141,3 (C); 152,8 (2) (C); 196,4 (C).

EM: 325 (M⁺).

Obtención de 1-metil-5-[1-(3,4,5-trimetoxibenzoil)]-1*H*-indol-3-carbaldehído (**46**).



Siguiendo el método E, 160 mg (0,49 mmol) de **45**, 46 μL (0,49 mmol) de POCl₃ y 0,60 mL de DMF reaccionan para dar 117 mg (68%) del carbaldehído **46**.

1-metil-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol (47):

IR: 1582 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XXXa) 3,80 (6H, s, OCH₃); 3,82 (3H, s, NCH₃); 3,88 (3H, s, OCH₃); 5,36 (1H, d; *J*=1,4, CH₂); 5,43 (1H, d; *J*=1,4, CH₂); 6,48 (1H, d, *J*=2,8, H₃); 6,61 (2H, s, H₂, H₆); 7,07 (1H, d, *J*=2,8, H₂); 7,26 (2H, sa, H₆, H₇); 7,62 (1H, d, *J*=1,4, H₄).

RMN ¹³C: (Fig. XXXb) 33,0 (N-CH₃); 56,2 (2) (OCH₃); 60,1 (OCH₃); 101,4 (CH); 106,0 (2) (CH); 108,9 (CH); 112,5 (CH₂); 120,9 (CH); 122,5 (CH); 128,4 (C); 129,4 (CH); 132,8 (C); 136,6 (C); 137,8 (C); 138,5 (C); 151,2 (C); 152,9 (2) (C).

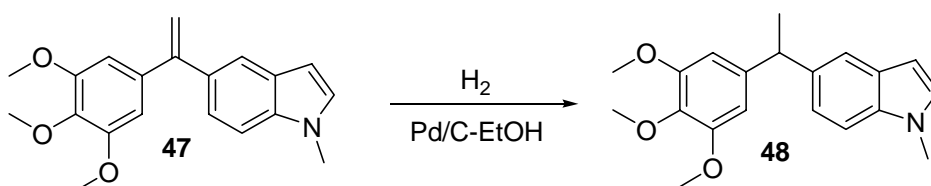
EM: 323 (M⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 13,05 min.

Columna C₈ t_R: 12,10 min.

Columna fenólica t_R: 11,51 min.

Obtención de 1-metil-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]-1H-indol (48):



Según el método F, 26 mg (0,08 mmol) de **47** y 8 mg de Pd/C en 8 mL de EtOH, bajo atmósfera de H₂, reaccionan para dar 20 mg (78%) del compuesto **48**.

1-metil-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]-1H-indol (48):

RMN ¹H: (Fig. XXXIa) 1,68 (3H, d; *J*=7,2, CHCH₃); 3,74 (3H, s, CH₃); 3,81 (6H, s, OCH₃); 3,82 (3H, s, CH₃); 4,20 (1H, c; *J*= 7,2, CHCH₃); 6,44 (1H, d; *J*= 3,0, H₃); 6,50 (2H, s, H₂, H₆); 7,02 (1H, d, *J*= 3,0, H₂); 7,09 (1H, dd; *J*=8,4; 1,6, H₆); 7,24 (1H, d; *J*=8,4, H₇); 7,49 (1H, d, *J*=1,6, H₄).

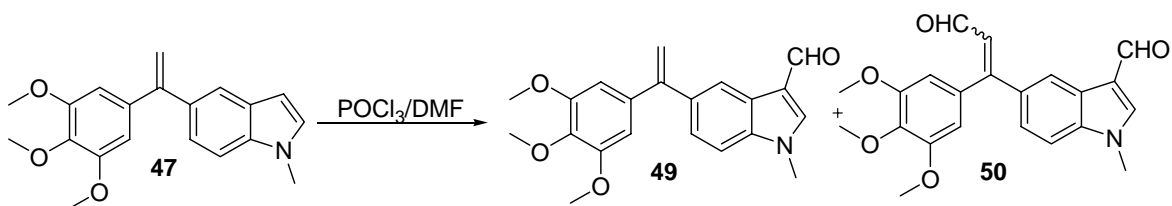
RMN ¹³C: (Fig. XXXIb) 22,6 (CH₃); 32,9 (NCH₃); 45,1 (CH); 56,1 (2) (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 100,8 (CH); 104,7 (2) (CH); 109,1 (CH); 119,0 (CH); 121,9 (CH); 128,7 (CH); 132,1 (C); 135,5 (C); 136,0 (C); 137,3 (C); 143,2 (C); 153,0 (2) (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 17,31 y 19,80 min. (2:1).

Columna C₈ t_R: 15,76 y 18,06 min. (2:1).

Columna fenólica t_R: 16,02 y 17,94 min. (2:1).

Obtención de 1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (49).



Seguindo el método E, 1,6 g (4,94 mmol) de **47**, 0,48 mL (5,2 mmol) de POCl₃ y 5,5 mL de DMF generan 1,80 g de crudo de reacción. Tras sucesivas cristalizaciones y cromatografías en columna (eluyente Hex/AcOEt 4/6), se obtienen 230 mg (13%) de monoaldehído **49**, 306 mg (16%) de la mezcla de dialdehídos **50**, 87 mg (4,6%) del dialdehídos **50Z** y 851 mg (47%) de una mezcla de monoaldehído **49** y dialdehídos **50**.

1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (49):

P.f.: 156-158 °C. (CH₂Cl₂/Hex).

IR (película): 1656, 1457, 1124, 785 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XXXIIa) 3,75 (6H, s, OCH₃); 3,82 (3H, s, NCH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃); 5,42 (1H, s); 5,45 (1H, s); 6,54 (2H, s H_{2'}, H_{6'}); 7,26 (2H, s); 7,66 (1H, s); 8,34 (1H, s); 9,91 (1H, s, CHO).

RMN ¹³C: (Fig. XXXIIb) 33,8 (NCH₃); 56,1 (2) (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 105,6 (2) (CH); 109,6 (CH); 114,1 (CH₂); 118,3 (C); 121,7 (CH); 125,1 (CH); 125,3 (C); 136,7 (C); 137,7 (C); 137,8 (C); 140,1 (CH); 150,4 (C); 152,9 (2) (C) 184,5 (CH).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,25 min.

Columna C₈ t_R: 13,61 min.

Columna fenólica t_R: 14,16 min.

(Z)1-metil-5-(3-oxo-1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-enil)-1H-indol-3-carbaldehído (50Z):

P.f.: 196-198 °C. (MeOH).

RMN ¹H: (Fig. XXXIIIa) 3,81 (6H, s, OCH₃); 3,90 (3H, s, NCH₃); 3,94 (3H, s, OCH₃); 6,54 (2H, s H_{2'}, H_{6'}); 6,63 (1H, d; J=8); 7,33 (1H, m); 7,34 (1H, m); 7,74 (1H, s); 8,42 (1H, sa); 9,58 (1H, d; J=8); 10,00 (1H, s, CHO).

RMN ¹³C: (Fig. XXXIIIb) 33,9 (NCH₃); 56,1 (2) (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 108,3 (2) (CH); 110,2 (CH); 118,5 (C); 122,8 (CH); 125,2 (CH); 125,4 (C); 127,2 (CH); 132,8 (2) (C); 134,7 (C); 139,1 (C); 140,5 (CH); 153,0 (2) (C); 163,2 (C); 184,5 (CH); 193,4 (CH).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 11,96 y 13,28 min. (4:1).

Columna C₈ t_R: 11,59 y 12,69 min. (4:1).

Columna fenólica t_R: 12,79 y 13,65 min. (4:1).

(Z y E)1-metil-5-(3-oxo-1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-enil)-1H-indol-3-carbaldehído (50):

RMN ¹H: (Fig. XXXIIIc) 3,64 (6H, s, OCH₃); 3,71 (6H, s, OCH₃); 3,79 (3H, s, NCH₃); 3,83 (3H, s, OCH₃); 3,85 (3H, s, NCH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃); 6,46 (2H, s H_{2'}, H_{6'}); 6,47 (1H, d; J=8); 6,48 (2H, s H_{2'}, H_{6'}); 6,99 (1H, d, J=1,8); 7,17 (1H, m); 7,37 (1H, m); 7,70 (1H, m); 7,76 (1H, m); 8,22 (1H, sa); 8,32 (1H, sa); 9,35 (1H, da; J=8); 9,48 (1H, da; J=8); 9,80 (1H, s, CHO); 9,82 (1H, s, CHO).

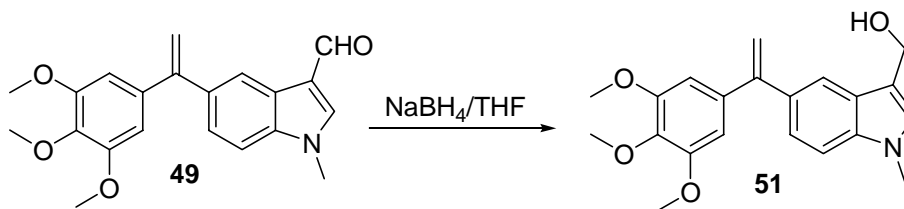
RMN ¹³C: (Fig. XXXIII d) 33,9 (2) (NCH₃); 56,1 (4) (OCH₃); 60,3 (OCH₃); 60,8 (OCH₃); 106,4 (2) (CH); 108,3 (2) (CH); 110,0 (CH); 110,3 (CH); 118,2 (C); 118,4 (C); 122,6 (CH); 124,8 (CH); 125,1 (CH); 125,3 (C); 126,8 (CH); 126,9 (CH); 128,4 (CH); 131,2 (C); 131,9 (C); 132,1 (C); 132,7 (2) (C); 134,5 (C); 135,9 (C); 138,9 (C); 139,1 (C); 140,1 (CH); 140,9 (CH); 152,8 (2) (C); 153,0 (2) (C); 163,0 (C); 163,2 (C) 184,4 (2) (CH); 193,2 (CH); 193,6 (CH).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 11,96 y 13,85 min. (7:3).

Columna C₈ t_R: 11,50 y 12,89 min. (7:3).

Columna fenólica t_R: 12,82 y 13,41 min. (7:3).

Obtención de 1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-indol-3-ilmetanol (51).



Según el método G, 51 mg (0,15 mmol) de **49** y 38 mg (1 mmol) de NaBH₄ en 10 mL de MeOH producen 39 mg (74%) del producto **51**.

1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-indol-3-ilmetanol (51):

IR (película): 3396, 1579, 1126 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XXXIVa) 3,77 (3H, s, NCH₃); 3,79 (6H, s, OCH₃); 3,89 (3H, s, OCH₃); 4,84 (2H, s, CH₂OH); 5,39 (1H, d; *J*=1,4); 5,45 (1H, d; *J*=1,4); 6,62 (2H, s, H₂, H₆); 7,07 (1H, s); 7,25 (2H, sa); 7,27 (1H, s).

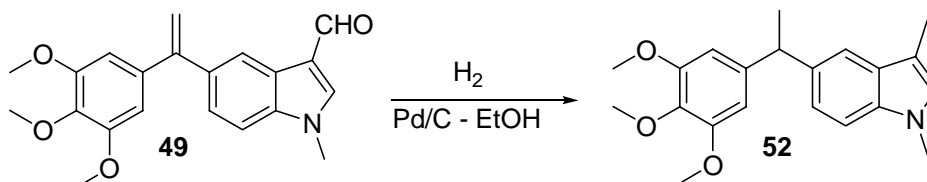
RMN ¹³C: (Fig. XXXIVb) 32,9 (N-CH₃); 56,2 (2) (OCH₃); 57,0 (CH₂); 61,0 (OCH₃); 105,8 (2) (CH); 109,0 (CH); 112,9 (CH₂); 115,1 (C); 119,0 (CH); 123,1 (CH); 126,9 (C); 128,4 (CH); 133,0 (C); 137,1 (C); 137,6 (C); 138,3 (C); 151,0 (C); 152,8 (2) (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,95 min.

 Columna C₈ t_R: 13,56 min.

 Columna fenólica t_R: 14,09 min.

Obtención de 1,3-dimetil-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]-1*H*-indol (52).



Según el método F, 20 mg (0,06 mmol) de **49** y 5 mg de Pd/C en 8 mL de EtOH, bajo atmósfera de H₂, reaccionan para dar 16 mg (83%) del compuesto **52**.

1-3-dimetil-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)etil]-1H-indol (52):

RMN ¹H: (Fig. XXXVa) 1,70 (3H, d; $J=7,2$, CHCH₃); 2,32 (3H, s, CH₃); 3,70 (3H, s, NCH₃); 3,82 (9H, s, OCH₃); 4,22 (1H, q; $J=7,2$); 6,51 (2H, s, H₂, H₆); 6,81 (1H, s); 7,07 (1H, dd; $J= 8,2$; 1,8, H₆); 7,19 (1H, d; $J=8,2$, H₇); 7,43 (1H, sa, H₄).

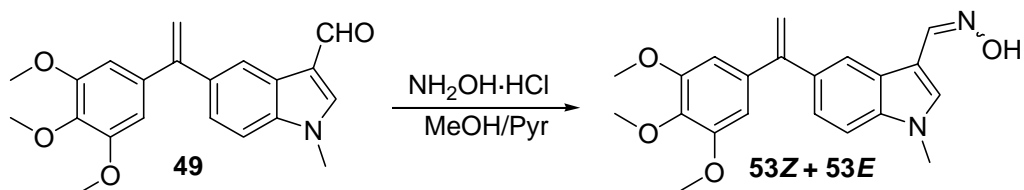
RMN ¹³C: (Fig. XXXVb) 9,69 (CH₃); 22,8 (CH₃); 32,6 (N-CH₃); 45,2 (CH); 56,1 (2) (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 104,8 (2) (CH); 109,0 (CH); 110,0 (C); 117,1 (CH); 121,7 (CH); 126,8 (CH); 128,6 (C); 135,7 (C); 136,0 (C); 136,5 (C); 143,4 (C); 153,0 (2) (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 17,23 y 18,52 min. (4:1)

Columna C₈ t_R: 15,79 y 16,75 min. (4:1)

Columna fenólica t_R: 16,00 y 16,73 min. (4:1)

Obtención de las oximas del 1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (53).



Según el método H, a una disolución de 157 mg (0,45 mmol) de **49** en 10 mL de MeOH, se añaden 311 mg (4,5 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y dos gotas de piridina. Tras 23 horas de reacción, se obtienen 145 mg (88%) de una mezcla 1:1 de las oximas **53Z** y **53E**, que se separan mediante CC, para dar 34 mg (21%) de uno de los isómeros y 53 mg (32%) del otro isómero. Cuando estas oximas se mantienen en disolución, se isomerizan para dar la mezcla obtenida inicialmente.

Oxima de 1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (53Z ó E).

P.f.: 162-164 °C. (CH₂Cl₂/Hex).

IR (película): 3450, 1579, 1093 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XXXVIa) 3,80 (9H, s, CH₃); 3,89 (3H, s, CH₃); 5,41 (1H, s); 5,48 (1H, s); 6,60 (2H, s H_{2'}, H_{6'}); 7,25 (2H, s); 7,27 (1H, s); 8,15 (1H, s); 8,32 (1H, s).

RMN ¹³C: (Fig. XXXVIb) 33,3 (NCH₃); 56,2 (2) (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 105,8 (2) (CH); 109,1 (CH); 113,4 (CH₂); 118,2 (C); 121,8 (CH); 124,0 (CH); 125,2 (2) (C); 131,8 (CH); 134,6 (C); 137,5 (C); 138,1 (C); 145,5 (CH); 150,8 (C); 152,8 (2) (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,92 y 15,50 min. (1:1).

Columna C₈ t_R: 13,67 y 13,97 min. (1:1).

Columna fenólica t_R: 14,41 y 14,69 min. (1:1).

Oxima de 1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (53Z ó E).

P.f.: 162-164 °C. (CH₂Cl₂/Hex).

IR (película): 3450, 1579, 1093 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XXXVIa) 3,80 (6H, s, OCH₃); 3,85 (3H, s, NCH₃); 3,90 (3H, s, OCH₃); 5,44 (1H, s); 5,46 (1H, s); 6,60 (2H, s H_{2'}, H_{6'}); 7,31 (2H, s); 7,77 (1H, s); 7,80 (1H, s); 8,27 (1H, s).

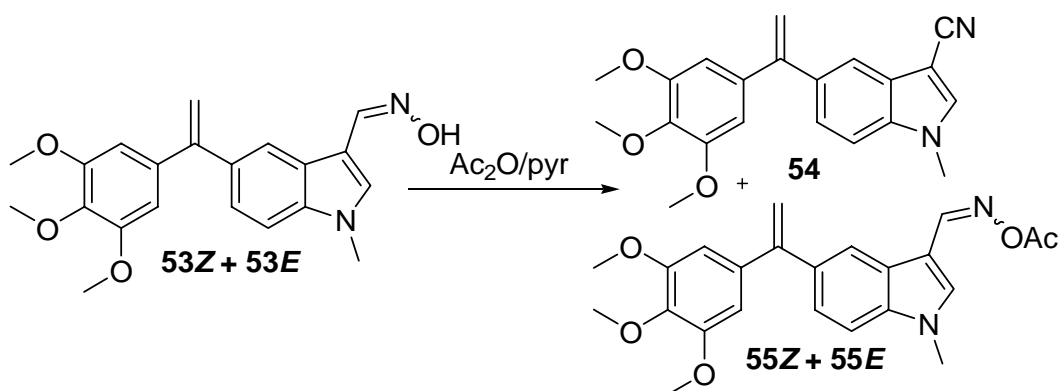
RMN ¹³C: (Fig. XXXVIb) 33,4 (N-CH₃); 56,2 (2) (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 105,7 (2) (CH); 109,4 (CH); 113,3 (CH₂); 118,2 (CH); 123,5 (CH); 127,2 (2) (C); 134,4 (C); 135,7 (CH); 135,7 (C); 137,7 (C); 138,0 (CH); 139,5 (C); 150,8 (C); 152,9 (2) (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,92 y 15,50 min. (1:1).

Columna C₈ t_R: 13,67 y 13,97 min. (1:1).

Columna fenólica t_R: 14,41 y 14,69 min. (1:1).

Obtención de 1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbonitrilo (**54**).



85 mg (0,23 mmol) de la mezcla de oximas **53Z** + **53E** se disuelven en 0,4 mL de piridina y posteriormente se añaden 0,4 mL de anhídrido acético. Tras 4 horas en agitación, la mezcla de reacción se recoge sobre HCl 2N y AcOEt, se lava con NaOH 4% hasta neutralización de las aguas de lavado y por último se lava con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente CH₂Cl₂/AcOEt 95/5) y se obtienen 27 mg (34%) del carbonitrilo **54** y 20 mg (21%) de la mezcla de acetatos **55Z** + **55E**. Los acetatos obtenidos se degradan en disolución.

1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbonitrilo (**54**):

IR (película): 2216, 1580, 1125 cm⁻¹.

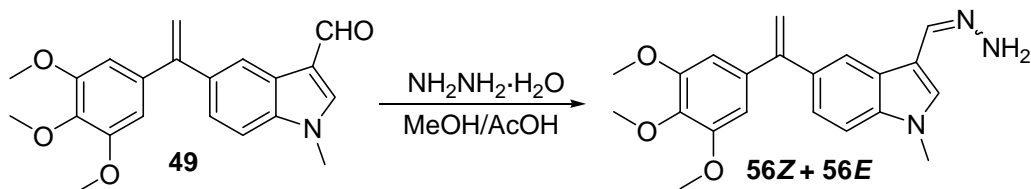
RMN ¹H: (Fig. XXXVIIa) 3,80 (6H, s, CH₃); 3,87 (3H, s, CH₃); 3,89 (3H, s, CH₃); 5,46 (2H, s); 6,55 (2H, s, H_{2'}, H_{6'}); 7,34 (2H, s); 7,54 (1H, s); 7,77 (1H, s).

RMN ¹³C: (Fig. XXXVIIb) 33,8 (NCH₃); 56,1 (2) (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 85,8 (C); 105,8 (2) (CH); 110,0 (CH); 114,2 (CH₂); 115,9 (C); 119,6 (CH); 124,9 (CH); 127,9 (C); 135,8 (C); 135,9 (CH); 136,1 (C); 137,6 (C); 138,2 (C); 150,2 (C); 153,0 (2) (C).

Acetil oxima de 1-metil -5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (**55Z** ó **E**).

RMN ¹H: (Fig. XXXVIIIa) 2,21 (3H, s, CH₃); 3,78 (6H, s, CH₃); 3,84 (3H, s, CH₃); 3,87 (3H, s, CH₃); 5,42 (1H, s); 5,49 (1H, s); 6,57 (2H, s H_{2'}, H_{6'}); 7,06 (1H, s); 7,27 (1H, s); 7,46 (1H, s); 8,17 (1H, s); 8,50 (1H, s).

Obtención de 1-metil-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-ilmetilen hidrazona (56).



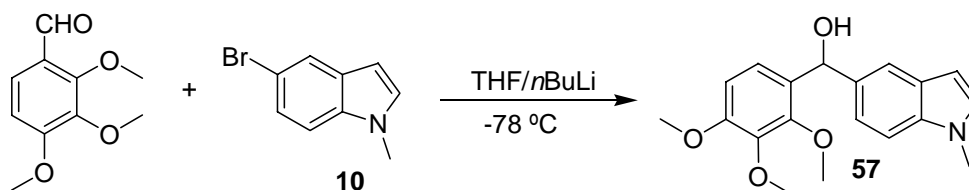
Según el método I, a una disolución de 154 mg (0,44 mmol) de **49** en 10 mL de MeOH se añade hidrato de hidrazina en exceso y dos gotas de ácido acético. Tras 24 horas de reacción, después de extraer y lavar el crudo de reacción y tratada la mezcla, se obtienen 138 mg (86%) de la mezcla de las hidrazonas **56Z** y **56E**.

1-metil-5-[1-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-ilmetilen hidrazona

(56 Z+E):

RMN ¹H: (Fig. XXXIXa) 3,81 (9H, s, OCH₃); 3,83 (6H, s, OCH₃); 3,85 (6H, s, NCH₃); 3,90 (3H, s, OCH₃); 5,47 (2H, s, CH₂); 5,54 (2H, s, CH₂); 6,56 (2H, s, H₂, H₆); 6,66 (2H, s, H₂, H₆); 7,01-7,50 (6H, m, H₄, H₆, H₇); 8,40 (1H, s, H₂); 8,57 (1H, s, H₂); 8,71 (1H, s, CH=NH₂); 8,93 (1H, s, CH=NH₂).

RMN ¹³C: (Fig. XXXIXb) 33,4 (2) (NCH₃); 56,2 (4) (OCH₃); 61,0 (2) (OCH₃); 104,9 (2) (CH); 105,8 (2) (CH); 109,1 (CH); 109,6 (CH); 112,0 (C); 112,5 (C); 113,3 (CH₂); 120,9 (CH); 122,5 (CH); 123,3 (CH); 124,0 (CH); 126,0 (2) (C); 134,0 (C); 134,6 (CH); 134,7 (CH); 136,1 (C); 136,6 (C); 137,7 (2) (C); 138,2 (C); 139,5 (C); 142,9 (C); 150,9 (C); 152,8 (2) (C); 153,1 (2) (CH); 155,0 (C).

Obtención de (1-metil-1*H*-indol-5-il)(2,3,4-trimetoxifenil)metanol (57).

Según el método C3, 500 mg (2,14 mmol) de **10**, 3,3 mL (5,2 mmol) de *n*BuLi y 564 mg (2,9 mmol) de 2,3,4-trimetoxibenzaldehído reaccionan durante 24 horas. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con Hex/AcOEt (7/3) y se obtienen 550 mg (71%) del compuesto **57**.

(1-metil-1*H*-indol-5-il)(2,3,4-trimetoxifenil)metanol (57):

IR(película): 3445, 1600, 1513 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. XLa) 3,65 (3H, s, N-CH₃); 3,76 (3H, s, OCH₃); 3,85 (3H, s, OCH₃); 3,87 (3H, s, OCH₃); 6,11 (1H, s, CHOH); 6,46 (1H, d, $J=3,1$, H₃); 6,65 (1H, d, $J=8,4$ H₅^{*}); 7,04 (1H, d, $J=3,1$, H₂); 7,07 (1H, d, $J=8,4$, H₆^{*}); 7,27 (2H, sa, H₆, H₇); 7,64 (1H, sa, H₄).

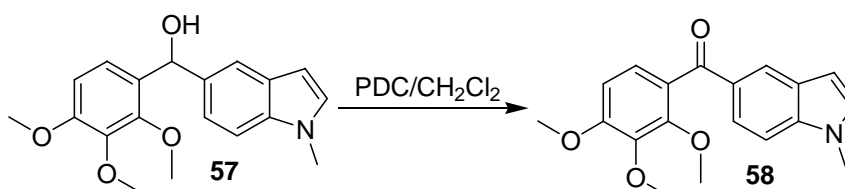
* Asignación intercambiable.

RMN ^{13}C : (Fig. XLb) 32,9 (N-CH₃); 56,1 (OCH₃); 60,9 (2) (OCH₃); 72,5 (CHOH); 101,2 (CH); 107,1 (CH); 109,1 (CH); 118,9 (CH); 120,9 (CH); 122,2 (CH); 128,4 (C); 129,3 (CH); 131,0 (C); 135,3 (C); 136,2 (C); 142,2 (C); 151,3 (C); 153,1 (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_{R} : 9,71 min.

Columna C₈ t_{R} : 9,29 min.

Columna fenólica t_{R} : 9,05 min.

Obtención de (1-metil-1*H*-indol-5-il)(2,3,4-trimetoxifenil)metanona (58).

Según el método D1, a una disolución de 1,60 g (4,9 mmol) de **57** en 50 mL de CH₂Cl₂, se añaden 2,76 g (7,35 mmol) de PDC. Tras 4 horas a temperatura ambiente, se obtienen 1,4 g de producto bruto que se cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando como eluyente Hex/AcOEt 7/3, para obtener 747 mg (47%) de **58**.

(1-metil-1H-indol-5-il)(2,3,4-trimetoxifenil)metanona (58):

P.f.: 104-106°C. (CH₂Cl₂/Hex).

IR (película): 1651, 1579, 820 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XLIa) 3,77 (3H, s, NCH₃); 3,83 (3H, s, OCH₃); 3,92 (3H, s, OCH₃); 3,93 (3H, s, OCH₃); 6,55 (1H, d, *J*=3,2, H₃); 6,73 (1H, d, *J*=8,6, H₅^{*}); 7,10 (1H, d, *J*=3,2, H₂); 7,11 (1H, d, *J*=8,6, H₆^{*}); 7,35 (1H, d, *J*=8,6, H₇); 7,85 (1H, dd, *J*=8,6; 1,6, H₆); 8,10 (1H, d, *J*=1,6, H₄).

* Asignación intercambiable.

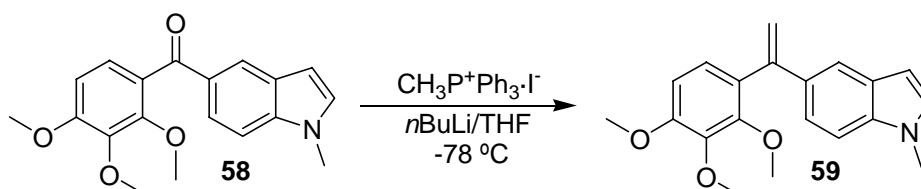
RMN ¹³C: (Fig. XLIb) 33,0 (N-CH₃); 56,1 (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 61,8 (OCH₃); 103,1 (CH); 106,8 (CH); 108,9 (CH); 123,4 (CH); 124,4 (CH); 125,4 (CH); 127,8 (2) (C); 130,4 (CH); 139,3 (C); 139,9 (C); 142,2 (C); 152,4 (C); 155,5 (C); 195,7 (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 10,79 min.

 Columna C₈ t_R: 10,22 min.

 Columna fenólica t_R: 9,99 min.

Obtención de 1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol (59).



Según el método B, a una suspensión de 3,24 g (8,05 mmol) de yoduro de metiltrifenilfosfonio en 40 mL de THF seco, se añaden 4,30 mL (6,90 mmol) de *n*BuLi (1,6 M en hexano) y 747 mg (2,30 mmol) de **58**. Tras 24 horas y purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con Hexano/AcOEt (8:2), se obtienen 493 mg (66%) del compuesto **59**.

1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol (59):

IR (película): 1595, 1493, 888 cm^{-1} .

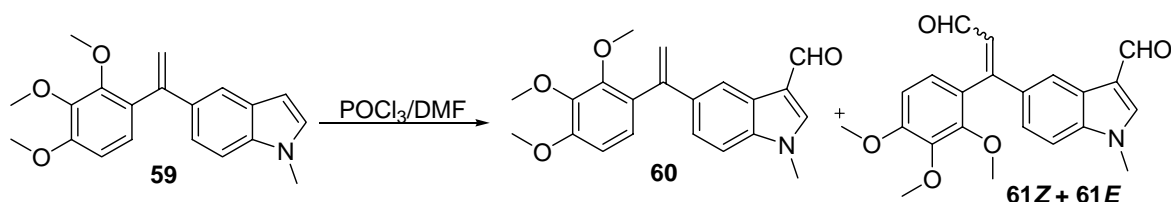
RMN ^1H : (Fig. XLIIa) 3,55 (3H, s, NCH_3); 3,78 (3H, s, OCH_3); 3,90 (3H, s, OCH_3); 3,92 (3H, s, OCH_3); 5,27 (1H, d, $J=1,8$, CH_2); 5,66 (1H, d, $J=1,8$, CH_2); 6,45 (1H, d, $J=3,1$, H_3); 6,71 (1H, d, $J=8,6$ H_5^*); 7,02 (1H, d, $J=8,6$ H_6^*); 7,03 (1H, d, $J=3,1$, H_2); 7,23-7,31 (2H, m, H_6 , H_7); 7,55 (1H, sa, H_4).

* Asignación intercambiable.

RMN ^{13}C : (Fig. XLIIb) 32,9 (N-CH_3); 56,1 (OCH_3); 60,7 (OCH_3); 60,9 (OCH_3); 101,9 (CH); 107,3 (CH); 109,3 (CH); 113,6 (CH_2); 120,4 (CH); 120,9 (CH); 123,3 (CH); 125,4 (C); 127,6 (C); 128,2 (C); 129,5 (CH); 137,4 (C); 142,4 (C); 151,4 (C); 154,2 (C); 156,7 (C).

HPLC: Columna C_{18} t_R : 13,24 min.
Columna C_8 t_R : 12,32 min.
Columna fenólica t_R : 11,63 min.

Obtención de 1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (60).



Seguendo el método F, 318 mg (0,98 mmol) de **59**, 0,093 mL (0,99 mmol) de POCl_3 y 1 mL de DMF, generan 214 mg de crudo de reacción, que se purifican mediante cromatografía en columna (eluyente Hex/AcOEt 4/6) para dar 36 mg (10%) de monoaldehído **60** y 62 mg (16%) de una mezcla de dialdehídos **61Z + 61E**.

1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído(60):

IR (película): 1657, 1095 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XLIIIa) 3,51 (3H, s, OCH₃); 3,81 (3H, s, NCH₃); 3,85 (3H, s, OCH₃); 3,89 (3H, s, OCH₃); 5,31 (1H, s); 5,66 (1H, s); 6,69 (1H, d, *J*=8,6, H₅); 6,99 (1H, d, *J*=8,6, H₆); 7,24 (2H, s); 7,61 (1H, m); 8,29 (1H, s); 9,92 (1H, s, CHO).

RMN ¹³C: (Fig. XLIIIb) 33,8 (NCH₃); 56,1 (OCH₃); 60,7 (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 107,1 (CH); 109,4 (CH); 115,4 (CH₂); 118,3 (C); 119,8 (CH); 123,6 (CH); 125,4 (CH); 125,4 (C); 129,5 (C); 137,4 (C); 137,5 (C); 139,7 (CH); 142,4 (C); 147,3 (C); 151,7 (C); 153,5 (C) 184,3 (CH).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,56 min.

 Columna C₈ t_R: 13,52 min.

 Columna fenólica t_R: 14,14 min.

(Z y E)1-metil-5-(3-oxo-1-(2,3,4-trimetoxifenil)prop-1-enil)-1H-indol-3-carbaldehído (61Z y E):

RMN ¹H: (Fig. LIVa) 3,44 (3H, s, CH₃); 3,50 (3H, s, CH₃); 3,80 (3H, s, CH₃); 3,84 (3H, s, CH₃); 3,86 (3H, s, CH₃); 3,88 (3H, s, CH₃); 3,89 (3H, s, CH₃); 3,91 (3H, s, CH₃); 6,49 (1H, d, *J*=8); 6,65 (1H, d, *J*=8); 6,73 (1H, d, *J*=8,6); 6,87(1H, d, *J*=8,6); 6,92 (1H, d, *J*=8,6); 7,23-7,42 (4H, m); 7,68 (1H, s); 7,73 (1H, s); 8,21 (1H, sa); 8,32 (1H, sa); 9,47 (1H, da; *J*=8); 9,51 (1H, da; *J*=8); 9,89 (1H, s, CHO); 9,90 (1H, s, CHO).

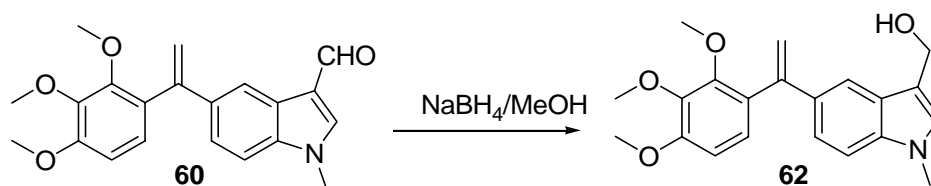
RMN ¹³C: (Fig. LIVb) 33,9 (2) (NCH₃); 56,1 (2) (OCH₃); 60,9 (4) (OCH₃); 107,0 (CH); 109,6 (CH); 110,1 (CH); 118,3 (C); 118,6 (C); 121,9 (CH); 123,6 (CH); 123,9 (CH); 125,4 (C); 125,7 (C); 126,0 (CH); 126,8 (CH); 127,6 (CH); 128,1 (C); 128,7 (CH); 129,3 (C); 132,0 (CH); 132,2 (CH); 133,3 (C); 135,1 (C); 138,2 (C); 138,9 (C); 140,3 (2) (CH); 142,6 (C); 152,1 (C); 152,6 (C); 155,0 (C); 155,4 (C); 159,8 (C); 160,9 (2) (C); 184,3 (2) (CH); 193,5 (CH); 194,0 (CH).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 11,08 y 12,22 min. (3:7).

 Columna C₈ t_R: 10,55 y 11,72 min. (3:7).

 Columna fenólica t_R: 11,71 y 12,79 min. (3:7).

Obtención de {1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-il} metanol (**62**).



Según el método G, 19 mg (0,05 mmol) de **60** y 20 mg (0,5 mmol) de NaBH₄ en 10 mL de MeOH producen 15 mg (85%) del alcohol **62**.

{1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-il}metanol (**62**):

IR (película): 3385, 1569, 1096, 1024 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XLVa) 3,51 (3H, s, NCH₃); 3,75 (3H, s, OCH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃); 3,91 (3H, s, OCH₃); 4,80 (2H, s, CH₂OH); 5,27 (1H, s); 5,64 (1H, s); 6,69 (1H, d, *J*=8,6, H₅^{*}); 7,00 (1H, d, *J*=8,6, H₆^{*}); 7,03 (1H, s); 7,23 (2H, s); 7,64 (1H, s).

*Asignación intercambiable.

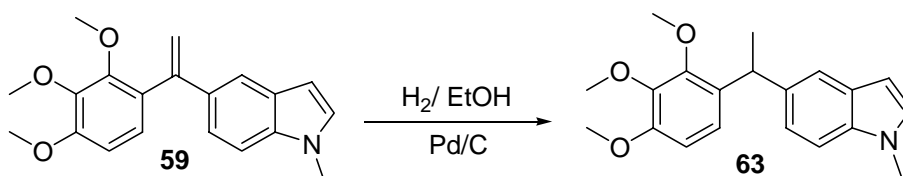
RMN ¹³C: (Fig. XLVb) 32,9 (N-CH₃); 56,0 (OCH₃); 57,0 (CH₂); 60,7 (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 106,9 (CH); 109,0 (CH); 114,0 (CH₂); 115,2 (C); 117,2 (CH); 121,6 (CH); 125,4 (CH); 126,9 (C); 128,2 (CH); 129,9 (C); 133,8 (C); 137,0 (C); 142,4 (C); 147,7 (C); 152,2 (C); 153,4 (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,97 min.

 Columna C₈ t_R: 13,52 min.

 Columna fenólica t_R: 13,76 min.

Obtención de 1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)etil]-1H-indol (**63**).



Según el método F, 26 mg (0,08 mmol) de **59** y 8 mg de Pd/C en 10 mL de EtOH, bajo atmósfera de H₂, reaccionan para dar 25 mg (96%) del producto reducido **63**.

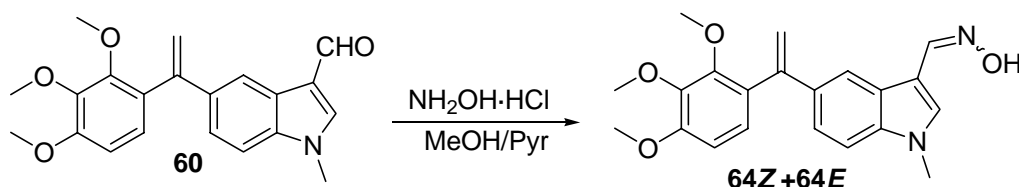
1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)etil]-1H-indol (63):

RMN ¹H: (Fig. XLVIa) 1,63 (3H, d, $J=7,2$); 3,65 (3H, s, NCH₃); 3,75 (3H, s, OCH₃); 3,80 (1H, m); 3,84 (3H, s, OCH₃); 3,87 (3H, s, OCH₃); 4,60 (1H, c, $J=7,2$, CHCH₃); 6,42 (1H, d, $J=3,1$, H₃); 6,63 (1H, d, $J=8,6$ H_{5'}); 6,93 (1H, d, $J=8,6$, H_{6'}); 7,01 (1H, d, $J=3,1$, H₂); 7,10 (1H, dd; $J=8,6; 1,4$, H₆); 7,22 (1H, d, $J=8,6$ H₇); 7,49 (1H, sa, H₄).

RMN ¹³C: (Fig. XLVIb) 22,5 (CH₃); 32,9 (N-CH₃); 37,7 (CH); 56,0 (OCH₃); 60,7 (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 100,7 (CH); 107,1 (CH); 108,9 (CH); 119,0 (CH); 122,0 (CH); 122,2 (CH); 128,5 (C); 128,9 (CH); 133,7 (C); 135,3 (C); 137,9 (C); 142,3 (C); 151,6 (C); 151,9 (C).

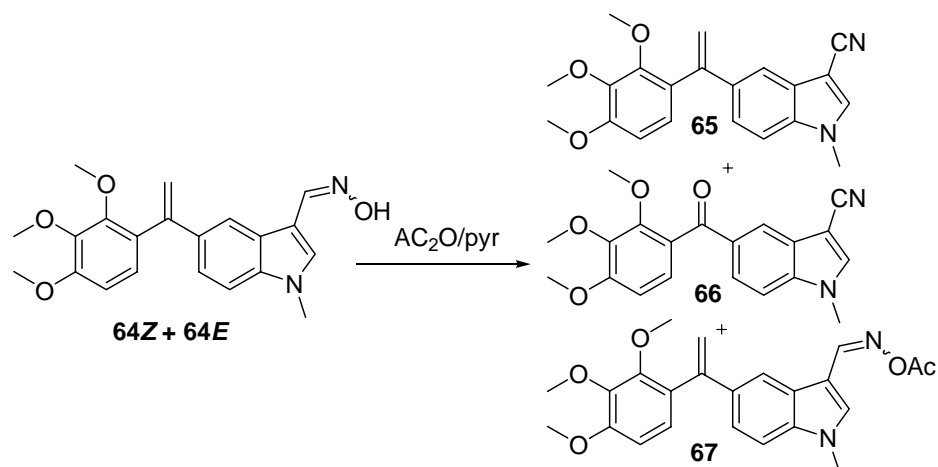
HPLC: Columna C₁₈ t_R: 18,22 min.
 Columna C₈ t_R: 16,49 min.
 Columna fenólica t_R: 16,45 min.

Obtención de las oximas del 1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (64).



Según el método H, a una disolución de 155 mg (0,44 mmol) de **60** en 10 mL de MeOH, se añaden 307 mg (4,4 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y dos gotas de piridina. Tras 24 horas de reacción, se obtienen 166 mg de una mezcla de las oximas **64Z** y **64E**, que se separan mediante CC para dar 83 mg (52%) de uno de los isómeros y 15 mg (9%) del otro isómero. Ambas oximas en disolución se isomerizan para regenerar la mezcla inicial.

Obtención de 1-metil -5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbonitrilo (65).



90 mg (0,25 mmol) de la mezcla de oximas **64Z** y **64E** se disuelven en 0,4 mL de piridina y posteriormente se añaden 0,4 mL de anhídrido acético. Tras 4 horas en agitación, la mezcla de reacción se recoge sobre HCl 2N y AcOEt, se lava con NaOH 4% con una disolución acuosa saturada de NaCl. Por último, se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora. El crudo de reacción (83 mg) se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/AcOEt 95/5) y se obtienen 27 mg (31%) del carbonitrilo **65**, 6 mg (7%) de la cetona-carbonitrilo **66** y 19 mg (19%) de la mezcla en que es mayoritario uno de los acetatos **67Z** o **67E**. Los acetatos obtenidos se degradan en disolución.

1-metil -5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbonitrilo (65):

IR (película): 2215, 1569, 1025, 808 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. XLVIIIa) 3,50 (3H, s, CH₃); 3,83 (3H, s, CH₃); 3,85 (3H, s, CH₃); 3,91 (3H, s, CH₃); 5,32 (1H, s, CH₂); 5,63 (1H, s, CH₂); 6,71 (1H, d; *J*=8,2, H₅^{*}); 6,99 (1H, d; *J*=8,2, H₆^{*}); 7,31 (1H, d, *J*=8,4, H₇); 7,33 (1H, da; *J*=8,4, H₆); 7,52 (1H, s, H₂); 7,66 (1H, sa, H₄).

* Asignación intercambiable.

RMN ¹³C: (Fig. XLVIIIb) 33,8 (N-CH₃); 56,1 (OCH₃); 60,7 (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 85,7 (C); 107,1 (CH); 110,0 (CH); 115,4 (CH₂); 116,1 (C); 117,8 (CH); 123,3 (CH); 125,2 (CH); 127,8 (C); 129,2 (C); 135,7 (C); 135,9 (CH); 136,7 (C); 142,4 (C); 147,0 (C); 151,2 (C); 153,0 (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 15,73 min.

 Columna C₈ t_R: 14,03 min.

 Columna fenólica t_R: 15,05 min.

1-metil -5-(2,3,4-trimetoxibenzoil)-1H-indol-3-carbonitrilo (66):

IR (película): 2219, 1653, 1593, 1097 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. IIa) 3,76 (3H, s, CH_3); 3,91 (3H, s, CH_3); 3,92 (3H, s, CH_3); 3,95 (3H, s, CH_3); 6,75 (1H, d; $J=8,6$, H_5^*); 7,13 (1H, d; $J=8,6$, H_6^*); 7,46 (1H, d; $J=8,6$, H_7); 7,65 (1H, s, H_2); 7,98 (1H, dd; $J=8,6$; 1,8, H_6); 8,12 (1H, d; $J=1,8$, H_4).

* Asignación intercambiable.

RMN ^{13}C : (Fig. IIb) 34,0 (N-CH_3); 56,1 (OCH_3); 61,0 (OCH_3); 61,9 (OCH_3); 87,5 (C); 106,9 (CH); 110,4 (CH); 123,7 (CH); 124,9 (CH); 125,2 (CH); 137,0 (CH).

Los carbonos cuaternarios no se observan.

HPLC: Columna C_{18} t_R : 12,43 y 15,76 min. (9:1).

Columna C_8 t_R : 11,95 y 14,71 min. (9:1).

Columna fenólica t_R : 12,88 y 15,16 min. (9:1).

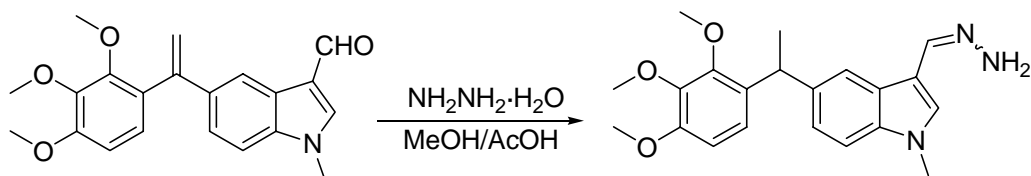
Acetil oxima de 1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (67):

RMN ^1H : (Fig. La) 2,19 (3H, s, CH_3); 3,53 (3H, s, OCH_3); 3,81 (3H, s, OCH_3); 3,85 (3H, s, OCH_3); 3,90 (3H, s, OCH_3); 5,29 (1H, s); 5,70 (1H, s); 6,69 (1H, d; $J=8,2$, H_5); 7,00 (1H, d; $J=8,2$, H_6); 7,26 (1H, d, $J=8,8$, H_7); 7,34 (1H, da; $J=8,8$, H_6); 7,43 (1H, s, H_2); 8,01 (1H, sa, H_4); 8,46 (1H, s, CH=NOH).

* Asignación intercambiable.

RMN ^{13}C : 20,0 (CH_3); 33,5 (NCH_3); 56,1 (OCH_3); 60,8 (OCH_3); 60,9 (OCH_3); 107,1 (CH); 109,3 (CH); 114,7 (CH_2); 120,0 (CH); 122,7 (CH); 125,0 (CH); 125,4 (CH); 133,6 (C); 135,9 (C); 150,1 (CH). Algunos carbonos cuaternarios no se observan.

Obtención de las hidrazonas de 1-{(1-metil-5-[1-(2,3,4-trimetoxifenil)etil]-1H-indol-3-il}carbaldehído (68).



Según el método I, a una disolución de 154 mg (0,44 mmol) de **60** en 10 mL de MeOH se añade hidrato de hidracina en exceso y dos gotas de ácido acético. Tras 24 horas de reacción y tratada la mezcla, se obtienen 141 mg (88%) de la mezcla de hidrazonas **68** en proporción aproximada 1:1.

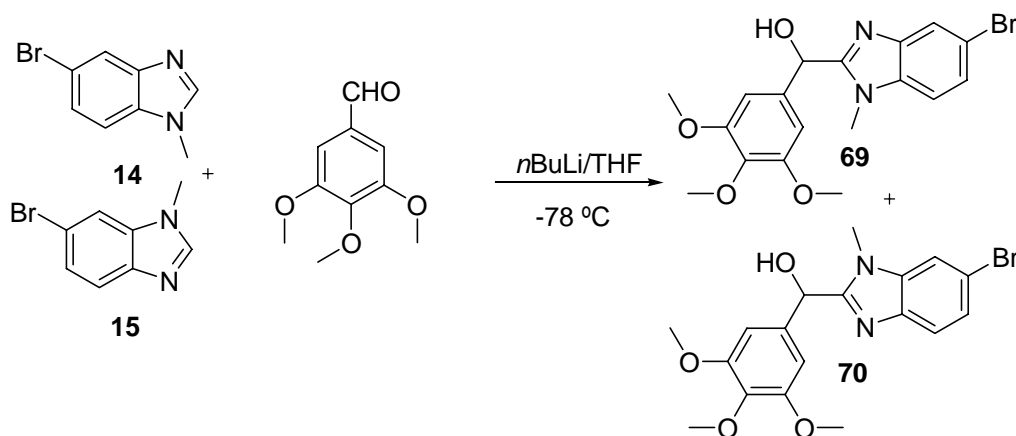
1-((1-metil-5-(1-(2,3,4-trimetoxifenil)etil)-1H-indol-3-il)metilen)hidrazona (68Z y E):

RMN ¹H: (Fig. LIa) 1,71 (6H, d; $J=3,2$, CHCH₃); 3,67 (3H, s, CH₃); 3,72 (3H, s, CH₃); 3,77 (3H, s, CH₃); 3,80 (3H, s, CH₃); 3,84 (6H, s, OCH₃); 3,86 (3H, s, CH₃); 3,88 (3H, s, CH₃); 4,66 (2H, m, CHCH₃); 6,62 (2H, d; $J=8,6$, H_{5'}); 6,65 (2H, d; $J=8,2$, H_{5'}); 6,95 (2H, d; $J=8,6$, H_{6'}); 6,96 (2H, d; $J=8,2$, H_{6'}); 7,00-7,30 (4H, m); 7,33 (1H, s); 7,46 (1H, s); 8,25 (1H, s); 8,36 (1H, s); 8,59 (1H, s, CH=NH₂); 8,92 (1H, s, CH=NH₂).

RMN ¹³C: (Fig. LIb) 22,4 (2) (CH₃); 33,4 (2) (NCH₃); 37,8 (2) (CH); 56,0 (2) (OCH₃); 60,8 (2) (OCH₃); 61,0 (2) (OCH₃); 107,1 (2) (CH); 109,4 (2) (CH); 111,9 (2) (C); 120,7 (CH); 120,9 (CH); 122,1 (2) (CH); 123,5 (CH); 123,8 (CH); 126,2 (2) (C); 132,0 (C); 133,5 (2) (CH); 134,1 (C); 136,5 (2) (C); 139,9 (C); 140,2 (C); 142,3 (2) (C); 151,5 (2) (C); 151,9 (2) (C); 154,0 (CH); 154,8 (CH).

IV.3.D. Síntesis de fenstatinas con un heterociclo distinto de indol.

Obtención de (5-bromo-1-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (**69**) y (6-bromo-1-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (**70**).



Seguendo el método C1, 1,00 g (4,74 mmol) de la mezcla de **14** y **15**, 5,94 mL (9,5 mmol) de *n*BuLi (1,6 M en hexano) y 1,12 g (5,69 mmol) de 3,4,5-trimetoxibenzaldehído en 40 mL de THF, producen 1,80 g de crudo de reacción. Después de cromatografiar en columna sobre gel de sílice, usando como eluyente Hex/AcOEt 1/1, se obtienen 429 mg (28%) de **69** y 508 mg (33%) de una mezcla del alcohol **70** y una impureza no identificada.

(5-bromo-1-metil-1*H*-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (**69**):

P.f.: 89-91 °C. (CH₂Cl₂/Hex).

RMN ¹H: (Fig. LIIa) 3,51 (3H, s, NCH₃); 3,78 (6H, s, OCH₃); 3,82 (3H, s, OCH₃); 6,04 (1H, sa, CHOH); 6,60 (2H, s, H₂, H₆); 7,00 (1H, d; *J*=8,4, H₇); 7,30 (1H, d; *J*=8,4; 1,8, H₆); 7,78 (1H, d; *J*=1,8, H₄).

RMN ¹³C: (Fig. LIIb) 30,6 (NCH₃); 56,2 (2) (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 69,6 (CH); 103,2 (2) (CH); 110,6 (CH); 115,1 (C); 121,6 (CH); 126,0 (CH); 135,0 (C); 135,2 (C); 137,5 (C); 142,0 (C); 153,4 (2) (C); 156,3 (C).

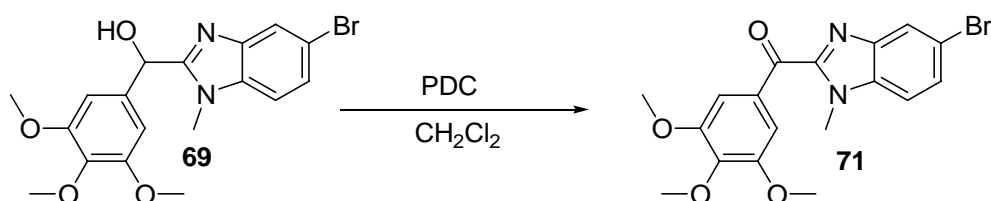
(6-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (70):

RMN ¹H: (Fig. LIIIa) 3,45 (3H, s, NCH₃); 3,72 (6H, s, OCH₃); 3,79 (3H, s, OCH₃); 6,08 (1H, d; *J*=2,8, CHOH); 6,58 (2H, s, H_{2'}, H_{6'}); 7,21 (1H, sa, H₇); 7,23 (1H, d; *J*=8,8; 1,8, H₅); 7,40 (1H, d; *J*=8,8, H₄).

RMN ¹³C: (Fig. LIIIb) 30,6 (NCH₃); 56,2 (2) (OCH₃); 60,9 (OCH₃); 69,6 (CH); 103,2 (2) (CH); 112,6 (CH); 116,3 (C); 120,1 (CH); 125,5 (CH); 135,1 (C); 137,2 (C); 139,8 (C); 141,9 (C); 153,3 (2) (C); 156,0 (C).

EM: 405 (M⁺).

Obtención de (5-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (71).



Seguendo el método D1, a una disolución de 67 mg (0,17 mmol) del alcohol **69** en 30 mL de CH₂Cl₂ seco, se añaden 93 mg (0,25 mmol) de PDC. Tras 24 horas de reacción se obtienen 46 mg (69%) de la cetona **71**.

(5-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (71):

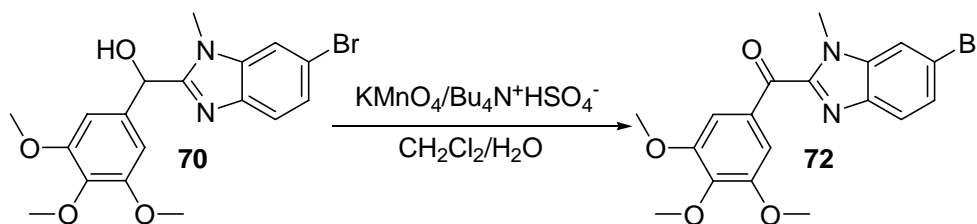
IR: 1645, 1455, 1321 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. LIVa) 3,91 (6H, s, CH₃); 3,94 (3H, s, CH₃); 4,08 (3H, s, CH₃); 7,34 (1H, d; *J*=9, H₇); 7,52 (1H, dd; *J*=9; *J*=1,8, H₆); 7,66 (2H, s, H_{2'}, H_{6'}); 8,02 (1H, d; *J*=1,8, H₄).

RMN ¹³C: (Fig. LIVb) 32,4 (NCH₃); 56,3 (2) (OCH₃); 61,0 (OCH₃); 108,9 (2) (CH); 111,8 (CH); 116,6 (C); 124,5 (CH); 128,7 (CH); 131,3 (C); 135,4 (C); 142,9 (C); 143,4 (C); 147,5 (C); 152,9 (2) (C); 184,5 (C).

EM: 407 (M⁺).

Obtención de (6-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (72).



Siguiendo el método D2, a una disolución de 508 mg (1,55 mmol) de la mezcla del alcohol **70** y una impureza no identificada en 30 mL de CH_2Cl_2 , se añaden 245 mg (1,55 mmol) de KMnO_4 , 40 mg de $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{HSO}_4^-$ y 1 mL de H_2O . Tras 24 horas de reacción, se obtienen 206 mg (41%) de la cetona **72** y 200 mg (40%) de una mezcla de **72** y una impureza no identificada.

(6-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (72):

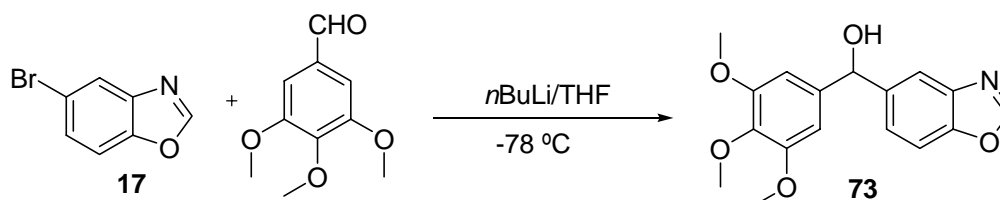
IR: 1645, 1445, 1125 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. LVa) 3,87 (6H, s, CH_3); 3,90 (3H, s, CH_3); 4,01 (3H, s, CH_3); 7,39 (1H, dd; $J=8,8$; $J=1,8$, H_6); 7,57 (1H, d; $J=1,8$, H_4); 7,63 (2H, s, H_2' , H_6'); 7,69 (1H, d; $J=8,8$; H_7).

RMN ^{13}C : (Fig. LVb) 32,3 (NCH_3); 56,2 (2) (OCH_3); 60,9 (OCH_3); 108,9 (2) (CH); 113,5 (CH); 119,0 (C); 123,1 (CH); 127,0 (CH); 131,3 (C); 137,3 (C); 140,5 (C); 143,3 (C); 147,2 (C); 152,7 (2) (C); 184,2 (C).

EM: 406 (M^+).

Obtención de (1,3-benzoxazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (73).



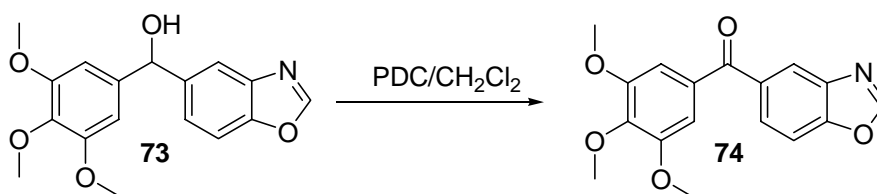
Siguiendo el método C1, 1,7 mL (2,73 mmol) de BuLi (1,6 M en hexano), 246 mg (1,24 mmol) de **17** y 291 mg (1,49 mmol) de 3,4,5-trimetoxibenzaldehído en 5 mL THF seco a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ reaccionan para dar, tras 24 horas, 267 mg de crudo de reacción, que fueron usados en el siguiente paso sin más purificación.

(1,3-benzoxazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (73):

RMN ¹H: (500MHz; CDCl₃) (Fig. LVIa) 3,83 (6H, s, OCH₃); 3,84 (3H, s, OCH₃); 5,91 (1H, s, CHOH); 6,63 (2H, s, H₂, H₆), 7,44 (1H, dd, *J*= 8,5, 1,5, H₆); 7,55 (1H, d, *J*= 8,5, H₇); 7,82 (1H, d, *J*=1,5, H₄); 8.10 (1H, s, H₄).

RMN ¹³C: (125 MHz; CDCl₃) (Fig. LVIb) 56,1 (2) (CH₃); 60,8 (CH₃); 76,1 (CH); 103,5 (2) (CH); 110,9 (CH); 118,5 (CH); 124,5 (CH); 137,4 (C); 139,5 (C); 140,1 (C); 140,9 (C); 149,4 (C); 153,1 (CH); 153,3 (2) (C).

Obtención de (1,3-benzoxazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (74).



Según el método D1, la adición de 478 mg (1,27 mmol) de PDC sobre 267 mg (0,85 mmol) de **73** en 20 mL de CH₂Cl₂ a 0 °C producen, tras 4 horas, 219 mg de crudo de reacción. Por purificación mediante cromatografía de columna de gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/AcOEt 8/2) se obtienen 68 mg (26%) del producto de oxidación **74**.

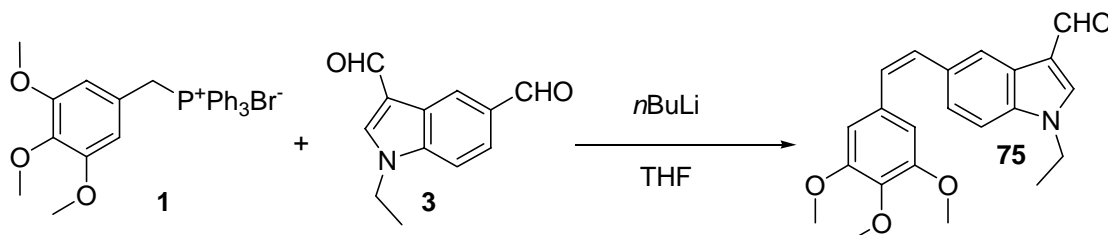
(1,3-benzoxazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (74):

RMN ¹H: (500MHz; CDCl₃) (Fig. LVIIa) 3,87 (6H, s, OCH₃); 3,95 (3H, s, OCH₃); 7,07 (2H, s, H₂, H₆); 7,70 (1H, d, *J*=8,3, H₆); 7,94 (1H, d, *J*=8,3, H₇); 8,22 (1H, s, H₄); 8,24 (1H, s, H₂).

RMN ¹³C: (125 MHz; CDCl₃) (Fig. LVIIb) 56,4 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 107,8 (2) (CH); 111,0 (CH); 123,0 (CH); 127,9 (CH); 132,6 (C); 134,9 (C); 139,9 (C); 142,2 (C); 152,4 (C); 152,9 (CH); 153,8 (2) (C); 194,8 (C).

IV.3.E. Síntesis de combretastatinas.

Obtención de (Z)-N-etil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (75).



A 466 mg (0,89 mmol) de **1** en THF seco (20 mL), a -40°C y en atmósfera de argón, se añaden 0,56 mL de *n*BuLi (0,89 mmol) y se mantiene 1 hora en agitación. A continuación, el iluro de fósforo formado se añade, lentamente, sobre una disolución de 189 mg (0,89 mmol) de **3** en 10 mL de THF seco, a -40°C y en atmósfera de argón y se deja que alcance progresivamente la temperatura ambiente. Transcurridas 24 horas, se vierte la reacción sobre cloruro de amonio y se extrae con CH_2Cl_2 . El conjunto de las fases orgánicas se lava hasta neutralidad con una disolución saturada de NaCl, se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad. Tras sucesivas cromatografías de columna usando como eluyentes Hex/AcOEt 7/3 y CH_2Cl_2 /AcOEt 96/4, se obtienen: 27 mg (5,1%) del compuesto **75**.

(Z)-N-etil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol-3-carbaldehído (75):

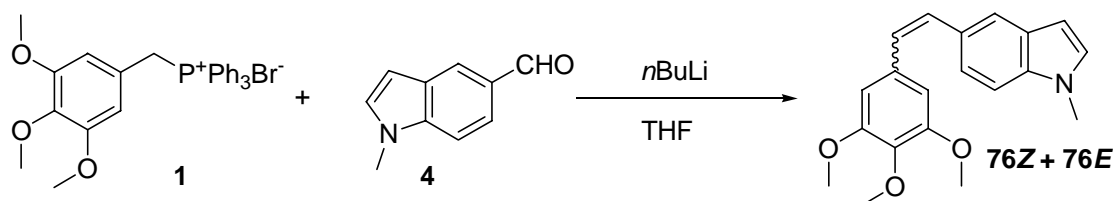
IR (película): 1655, 1459, 1397, 1124, 784 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. LVIIIa) 1,51 (3H, t, $J=7,2$, CH_2CH_3); 3,61 (6H, s, OCH_3); 3,82 (3H, s, CH_3); 4,19 (2H, c, $J=7,2$, CH_2CH_3); 6,51 (1H, d, $J=12,2$, H_{1a}^*); 6,50 (2H, s, H_2 , H_6); 6,73 (1H, d, $J=12,2$, H_{2a}^*); 7,19 (1H, d, $J=8,8$, H_7); 7,30 (1H, dd, $J=8,8$, 2,0, H_6); 7,72 (1H, s, H_2); 8,26 (1H, sa, H_4); 9,96 (1H, s, CHO).

* Asignación intercambiable.

RMN ^{13}C : (Fig. LVIIIb) 15,1 (CH_3); 42,0 (CH_2); 55,9 (2) (CH_3); 61,0 (CH_3); 106,2 (2) (CH); 109,4 (CH); 118,2 (C); 122,8 (CH); 125,2 (CH); 125,6 (C); 129,4 (CH); 130,4 (CH); 132,3 (C); 132,9 (C); 136,0 (C); 137,2 (C); 137,6 (CH); 152,8 (2) (C); 184,4 (CH).

EM: 365 (M^+).

Obtención de (Z)-N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol (76).

Seguindo el método B, a una suspensión de 1,81 g (3,46 mmol) de **1** se añaden 2,2 mL de *n*BuLi (3,46 mmol). Después de 1 hora, se adicionan 500 mg (3,14 mmol) de **4**. Transcurridas 16 horas, el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía de columna sobre sílice, utilizando como eluyente Hexano/AcOEt 85:15 y se obtienen 208 mg (21%) de **76Z** y 388 mg (38%) de **76E**.

(Z)-N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol (76Z):

IR (película): 1614, 1574, 1503, 1126, 971 cm^{-1} ,

RMN ^1H : (Fig. LIXa) 3,63 (6H, s, OCH₃); 3,76 (3H, s, CH₃); 3,84 (3H, s, OCH₃); 6,40 (1H, d; $J=2,6$, H₃); 6,43 (1H, d; $J=12,0$, H_{1a}*); 6,58 (2H, s, H₂, H₆); 6,70 (1H, d; $J=12,0$, H_{2a}*); 7,00 (1H, d; $J=2,6$, H₂); 7,17 (1H, da, $J=8,6$, H₇); 7,22 (1H, dd, $J=8,6$; 1,4, H₆); 7,60 (1H, sa, H₄).

* Asignación intercambiable

RMN ^{13}C : (Fig. LIXb) 32,8 (CH₃); 55,9 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 101,3 (CH); 106,2 (2) (CH); 108,9 (CH); 121,6 (CH); 123,0 (CH); 127,9 (CH); 128,3 (C); 128,6 (C); 128,9 (CH); 131,4 (CH); 133,5 (C); 136,1 (C); 137,1 (C); 153,0 (2) (C).

(E)-N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1H-indol (76E):

P.f.: 110 °C (Éter).

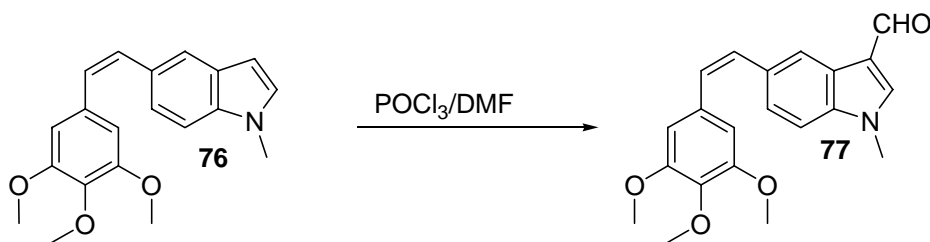
IR (película): 1579, 1506, 1126, 1006 cm^{-1} .

RMN ^1H : (Fig. LIXc) 3,81 (3H, s, OCH₃); 3,87 (3H, s, CH₃); 3,93 (6H, s, OCH₃); 6,49 (1H, d; $J=3,3$, H₃); 6,77 (2H, s, H₂, H₆); 7,00 (1H, d, $J=16,4$, H_{1a}*); 7,06 (1H, d; $J=3,3$, H₂); 7,16 (1H, d; $J=16,4$, H_{1a}*); 7,31 (1H, d; $J=8,8$, H₇); 7,47 (1H, dd, H₇; $J_1=8,8$, $J_2=1,6$, H₆); 7,74 (1H, d; $J=1,6$, H₄).

* Asignación intercambiable

RMN ^{13}C : (Fig. LIXd) 32,9 (CH₃); 56,2 (2) (CH₃); 61,0 (CH₃); 101,4 (CH); 103,4 (2) (CH); 109,7 (CH); 119,7 (CH); 120,2 (CH); 125,9 (CH); 129,0 (2) (C); 129,7 (CH); 129,8 (CH); 134,1 (C); 136,7 (C); 137,5 (C); 153,5 (2) (C).

Obtención de (Z)-N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]indol-3-carbaldehído (77).



Según el método E, 0,125 mL (1,35 mmol) de POCl_3 se añaden sobre 1 mL de DMF seca. Media hora después se añaden 395 mg (1,23 mmol) de **76Z**. Después de 2 horas se obtienen 400 mg (93%) de **77**.

(Z)-N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]indol-3-carbaldehído (77):

P.f.: 144-146 °C. ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hex}$).

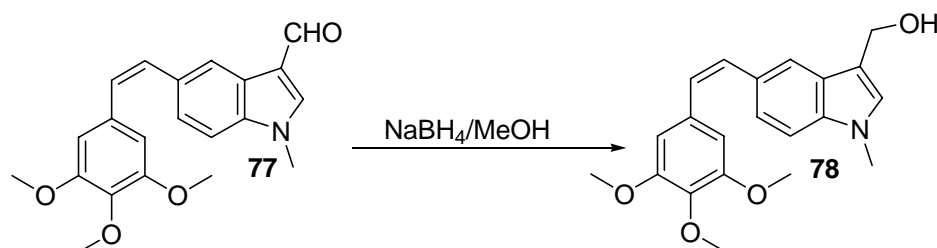
RMN ^1H : (Fig. LXa) 3,62 (6H, s, OCH_3); 3,84 (3H, s, NCH_3); 3,86 (3H, s, OCH_3); 6,52 (2H, s, H_2, H_6); 6,52 (1H, d; $J=12,4$, H_{1a}^*); 6,73 (1H, d; $J=12,4$, H_{2a}^*); 7,18 (1H, d; $J=9,2$, H_7); 7,32 (1H, dd, $J=9,2; 2,2$, H_6); 7,66 (1H, sa, H_4); 8,27 (1H, s, H_2); 9,98 (1H, s, CHO).

* Asignación intercambiable.

RMN ^{13}C : (Fig. LXb) 33,5 (CH_3); 55,8 (2) (CH_3); 60,8 (CH_3); 106,2 (2) (CH); 109,6 (CH); 117,9 (C); 122,4 (CH); 125,1 (CH); 125,2 (C); 129,2 (CH); 130,3 (CH); 132,1 (C); 132,8 (C); 137,0 (C); 137,2 (C); 140,1 (CH); 152,8 (2) (C); 184,3 (CH).

HPLC: Columna C_{18} t_R : 14,66 min.
 Columna C_8 t_R : 13,42 min.
 Columna fenólica t_R : 14,24 min.

Obtención de (Z)-{N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]indol-3-il}metanol (78).



Siguiendo el método G, 20 mg de NaBH₄ se añaden sobre una disolución de 25 mg (0,07 mmol) de **77** en 10 mL de MeOH. Tras media hora de reacción, se obtienen 22 mg (89%) del alcohol **78**.

(Z)-{N-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]indol-3-il}metanol (78):

IR (película): 3413, 1579, 1124 cm⁻¹.

RMN ¹H: (Fig. LXIa) 3,64 (6H, s, OCH₃); 3,74 (3H, s, CH₃); 3,84 (3H, s, OCH₃); 4,79 (2H, sa; CH₂OH); 6,44 (1H, d; *J*=12,2, H_{1a}*); 6,57 (2H, s, H₂, H₆); 6,71 (1H, d; *J*=12,2, H_{2a}*); 7,02 (1H, s, H₂); 7,14 (1H, d, *J*=8,6); 7,25 (1H, dd; *J*=8,6; 1,8, H₆); 7,67 (1H, d, *J*=1,8, H₄).

* Asignación intercambiable.

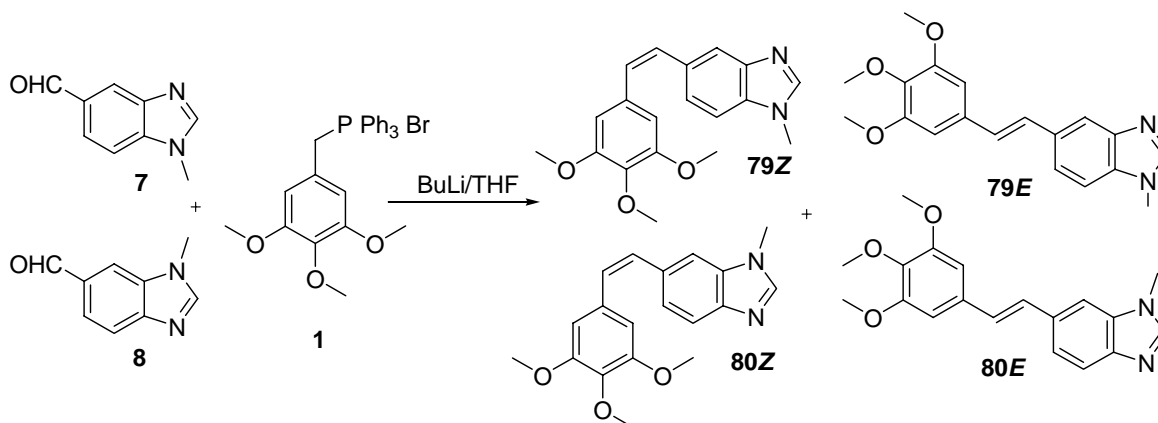
RMN ¹³C: (Fig. LXIb) 32,8 (CH₃); 56,0 (2) (CH₃); 57,0 (CH₂); 61,0 (CH₃); 106,1 (2) (CH); 109,0 (CH); 115,0 (C); 120,0 (CH); 123,4 (CH); 127,0 (C); 128,1 (2) (CH); 128,5 (C); 131,1 (CH); 133,3 (C); 136,6 (C); 137,0 (C); 152,9 (2) (C).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 14,82 min.

Columna C₈ t_R: 13,50 min.

Columna fenólica t_R: 13,96 min.

Obtención de (*Z* y *E*)-1-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-benzimidazol (79*Z* y 79*E*) y de (*Z* y *E*)-1-metil-6-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-benzimidazol (80*Z* y 80*E*).



Seguindo el método B, 1,38 g (2,63 mmol) de bromuro de 3,4,5-trimetoxibenciltripenilfosfonio, 1,8 mL de *n*BuLi (2,88 mmol) y 383 mg (2,39 mmol) de una mezcla de **7** y **8** en proporción 1:1, reaccionan para dar 1,48 g de crudo de reacción, que se purifican mediante cromatografía en columna de sílice y se obtienen 2 fracciones de 206 mg y de 326 mg de mezclas de los isómeros *Z* y *E*, que se sometieron a separación mediante HPLC.

(*Z*)-1-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-benzimidazol (79*Z*) y (*Z*)-1-metil-6-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-benzimidazol (80*Z*):

RMN ¹H: Tabla I (Fig.LXIIa).

RMN ¹³C: Tabla II.

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 13,83 y 13,93 min. (1:1)

Columna C₈ t_R: 13,08 y 13,14 min. (1:1)

Columna fenólica t_R: 13,52 y 13,68 min. (1:1)

(*E*)-1-metil-5-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-benzimidazol (79*E*) o (*E*)-1-metil-6-[2-(3,4,5-trimetoxifenil)vinil]-1*H*-benzimidazol (80*E*):

RMN ¹H: Tabla III (Fig LXIIIa).

RMN ¹³C: Tabla IV.

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 13,79 min.

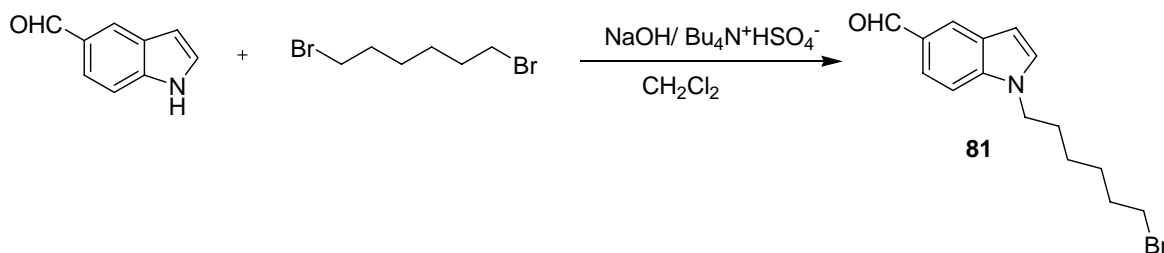
Columna C₈ t_R: 12,86 min.

Columna fenólica t_R: 13,42 min.

IV.4. SÍNTESIS DE COMPUESTOS MACROCÍCLICOS.

IV.4.A. Materiales de partida.

Obtención del 1-(6-bromohexil)-1*H*-indol-5-carbaldehído (**81**).



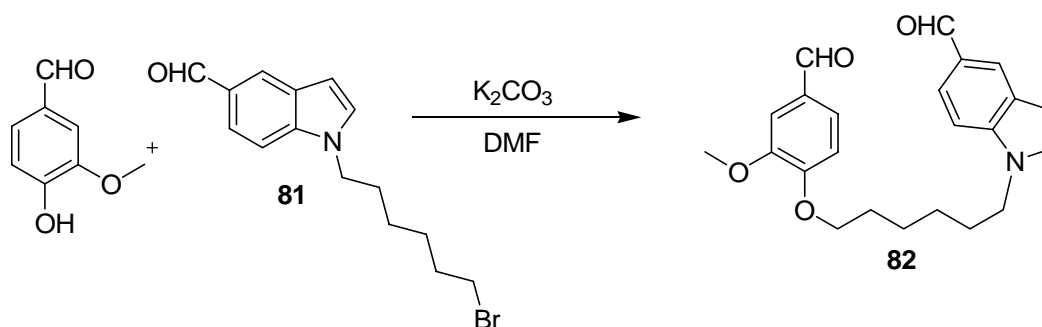
Sobre una disolución de 2,00 g (13,8 mmol) de 1*H*-indol-5-carbaldehído en 40 mL de CH₂Cl₂ se añaden 1,10 g (27,6 mmol) de NaOH y 200 mg de *n*-Bu₄N⁺HSO₄⁻ y se mantiene 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se añaden 4,25 mL (27,6 mmol) de 1,6-dibromohexano y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 48 h, tras las cuales se evapora el CH₂Cl₂. El bruto de reacción se percola sobre gel de sílice, eluyéndose primero con hexano para retirar el exceso de 1,6-dibromohexano y, finalmente, con CH₂Cl₂ para obtener 3,04 g (72%) de producto **81**.

1-(6-bromohexil)-1*H*-indol-5-carbaldehído (**81**):

RMN ¹H: (Fig. LXIVa) 1,30 (2H, m); 1,38 (2H, m); 1,76 (2H, m); 1,80 (2H, m); 3,32 (2H, t, *J*=6,6, H₆); 4,09 (2H, t, *J*=7,0, H₁); 6,62 (1H, d, *J*=3,3, H₃); 7,15 (1H, d, *J*=3,3, H₂); 7,37 (1H, d, *J*=8,4, H₇); 7,74 (1H, dd, *J*=8,4; *J*=1,5, H₆); 8,10 (1H, d, *J*=1,5, H₄); 9,99 (1H, s, CHO).

RMN ¹³C: (Fig. LXIVb) 26,1 (CH₂); 27,7 (CH₂); 30,1 (CH₂); 32,6 (CH₂); 33,8 (CH₂); 46,5 (CH₂); 103,4 (CH); 110,0 (CH); 121,7 (CH); 126,5 (CH); 128,4 (C); 129,3 (C); 129,9 (CH); 139,3 (C); 192,4 (CH).

Obtención de 1-[6-(4-formil-2-metoxifenoxi)hexil]-1*H*-indol-5-carbaldehído (82).



A una disolución de 1,72 g (11,3 mmol) de vainillina en 40 mL de DMF seca, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añaden 10 g de K_2CO_3 y se mantiene en agitación durante 30 minutos. A continuación, se añaden 2,90 g (9,44 mmol) de 1-(6-bromohexil)-1*H*-indol-5-carbaldehído (**81**) disueltos en 10 mL de DMF seca y se aumenta la temperatura hasta 70 °C. Transcurridas 48 h, se recoge sobre 150 mL de hexano, se filtra para retirar las sales y se evapora hasta sequedad. Posteriormente, se redissuelve en CH_2Cl_2 y se lava con NaOH al 4% y con agua saturada de NaCl hasta pH neutro de las aguas de lavado, el conjunto de las fases orgánicas se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad, obteniéndose 3,41 g (95%) de producto **82**.

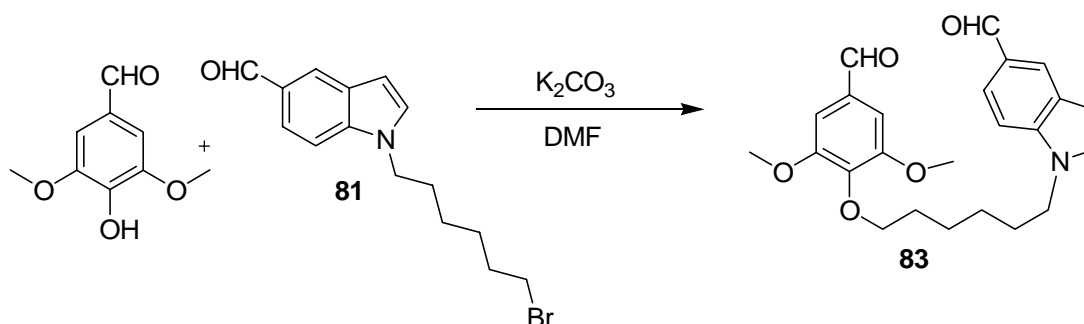
1-[6-(4-formil-2-metoxifenoxi)hexil]-1*H*-indol-5-carbaldehído (82):

IR: 1693, 1596, 808, cm^{-1} .

RMN 1H : (Fig. LXVa) 1,35 (2H, m); 1,45 (2H, m); 1,83 (2H, m); 1,86 (2H, m); 3,89 (3H, s, OCH_3); 4,05 (2H, t, $J=6,6$, $H_{1'}$); 4,17 (2H, t, $J=7,0$, $H_{6'}$); 6,62 (1H, d; $J=3,3$, H_3); 6,91 (1H, d; $J=8,4$, $H_{6''}$); 7,18 (1H, d; $J=3,3$, H_2); 7,39-7,43 (3H, $H_{2''}$, $H_{5''}$, H_7); 7,70 (1H, dd; $J=8,4$; $J=1,4$, H_6); 8,13 (1H, d; $J=1,5$, H_4); 9,83 (1H, s, CHO); 10,00 (1H, s, CHO).

RMN ^{13}C : (Fig. LXVb) 25,4 (CH_2); 26,4 (CH_2); 28,7 (CH_2); 30,0 (CH_2); 46,3 (CH_2); 55,8 (CH_3); 68,7 (CH_2); 103,2 (CH); 109,3 (CH); 110,0 (CH); 111,4 (CH); 121,5 (CH); 126,4 (CH); 126,6 (CH); 128,3 (C); 129,2 (C); 129,8 (CH); 129,8 (C); 139,2 (C); 149,7 (C); 154,0 (C); 190,7 (CH); 192,2 (CH).

Obtención de 1-[6-(4-formil-2,6-dimetoxifenoxi)hexil]-1*H*-indol-5-carbaldehído (83).



A una disolución de 2,16 g (11,87 mmol) de siringaldehído en 40 mL de DMF seca, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añaden 10 g de K_2CO_3 y se mantiene en agitación durante 30 minutos. A continuación, se añaden 3,05 g (9,89 mmol) de 1-(6-bromohexil)-1*H*-indol-5-carbaldehído (**81**) disueltos en 10 mL de DMF seca y se aumenta la temperatura hasta 70 °C. Transcurridas 48 h, se recoge sobre 150 mL de hexano, se filtra para retirar las sales y se evapora hasta sequedad. Posteriormente, se redisuelve en CH_2Cl_2 y se lava con NaOH al 4% y con agua saturada de NaCl hasta pH neutro de las aguas de lavado, el conjunto de las fases orgánicas se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad, obteniéndose 3,30 g (81%) del producto **83**.

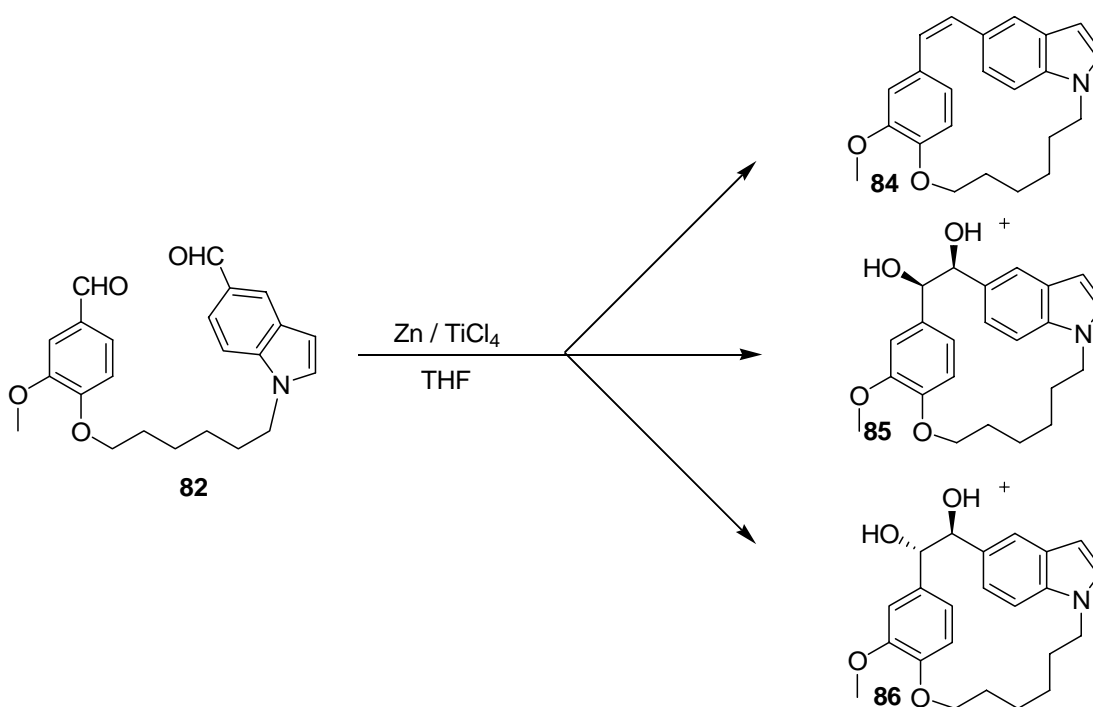
1-[6-(4-formil-2,6-dimetoxifenoxi)hexil]-1*H*-indol-5-carbaldehído (83):

RMN 1H : (Fig. LXVIa) 1,20 (2H, m); 1,40 (2H, m); 1,65 (2H, m); 1,72 (2H, m); 3,71 (6H, s, OCH_3); 3,92 (2H, m, $H_{1'}$); 3,99 (2H, m, $H_{6'}$); 6,48 (1H, d; $J=3,3$, H_3); 6,97 (2H, s, $H_{2'}$, $H_{6''}$); 7,07 (1H, d; $J=3,3$, H_2); 7,26 (1H, d; $J=8,4$, H_7); 7,61 (1H, dd; $J=8,4$, H_6); 7,96 (1H, s, H_4); 9,70 (1H, s, CHO); 9,85 (1H, s, CHO).

RMN ^{13}C : (Fig. LXVIb) 25,4 (CH_2); 26,5 (CH_2); 29,9 (CH_2); 30,2 (CH_2); 46,5 (CH_2); 56,1 (2) (CH_3); 73,2 (CH_2); 103,2 (CH); 106,6 (2) (CH); 110,0 (CH); 121,4 (CH); 126,4 (CH); 128,2 (C); 129,1 (C); 129,9 (CH); 131,6 (C); 139,2 (C); 142,7 (C); 153,8 (2) (C); 191,1 (CH); 192,3 (CH).

IV.4.B. Macrociclos.

Obtención de (2Z)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),2,4(24),5,7,9,19,22-octaeno (**84**), (cis)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (**85**) y (trans)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (**86**).



A una suspensión de 6,43 g (96,8 mmol) de Zinc en 200 mL de THF seco se le añaden, a 0 °C, 9,16 g (48,2 mmol) de TiCl₄ y se mantiene en agitación hasta alcanzar temperatura ambiente. A continuación, se aumenta la temperatura hasta 66 °C y se adicionan lentamente 1,66 g (4,37 mmol) del dialdehído **82** disueltos en 100 mL de THF seco. La reacción se mantiene a reflujo y bajo atmósfera de argón durante 5 h, tras las cuales la mezcla de reacción se vierte sobre una mezcla de AcOEt y HCl 2N, se extrae y se lava con agua saturada de NaCl hasta pH neutro de las aguas de lavado, se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad, obteniéndose 1,61 g de producto bruto. Después de cromatografiar en columna de gel de sílice (eluyente Hex/AcOEt 9/1), se obtienen 158 mg (10%) de olefina **84**, 362 mg (21%) del diol *cis* **85** y 462 mg (27%) del diol *trans* **86**.

(2Z)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),2,4(24),5,7,9,19,22-octaeno (84):

IR: 1509, 1262 cm⁻¹.

RMN ¹H: Tabla III (Fig. LXVIIa).

RMN ¹³C: Tabla V (Fig. LXVIIb).

EM: 370 (M⁺Na).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 19,44 min.

 Columna C₈ t_R: 17,45 min.

 Columna fenólica t_R: 17,44 min.

(cis)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo [17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}] tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (85):

RMN ¹H: Tabla III (Fig. LXVIIIb).

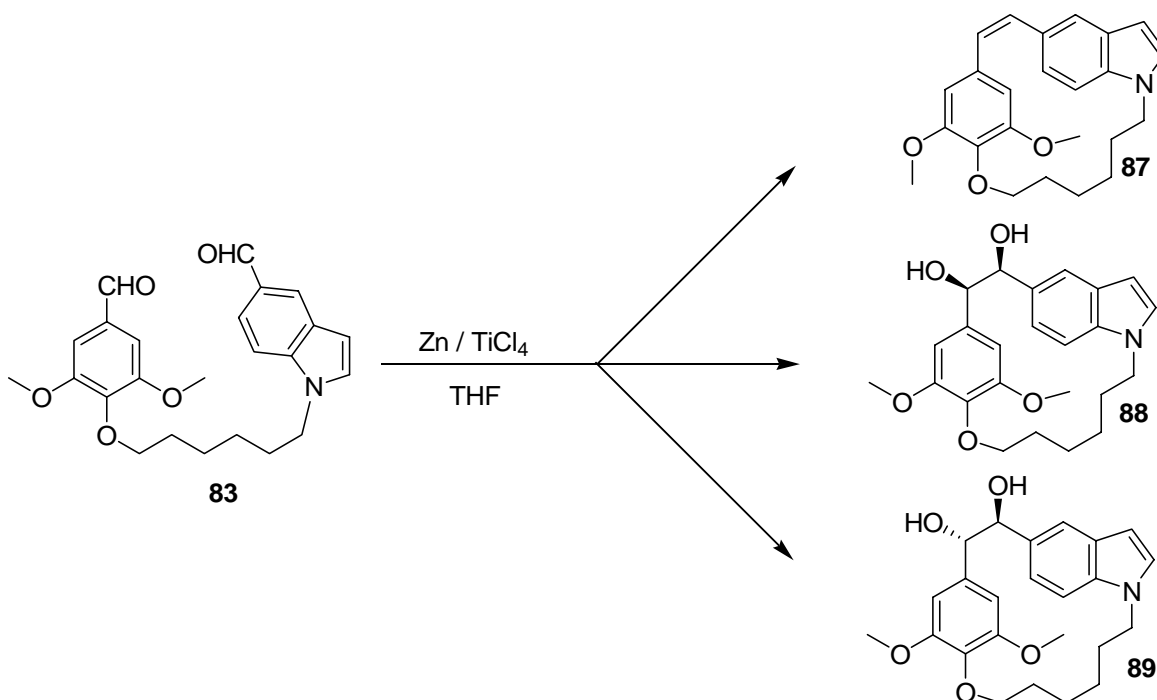
EM: 404 (M⁺Na).

(trans)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (86):

RMN ¹H: Tabla III (Fig. LXIXb).

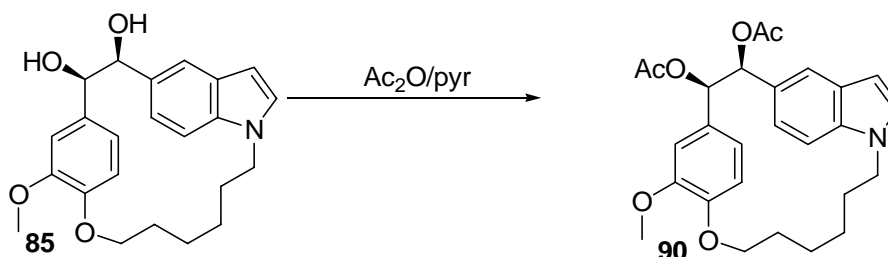
EM: 404 (M⁺Na).

Obtención de (2Z)-20,23-dimetoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),2,4(24),5,7,9,19,22-octaeno (**87**), (cis)-20,23-dimetoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (**88**) y (trans)-20,23-dimetoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (**89**).



A una suspensión de 2,04 g (30,72 mmol) de Zinc en 200 mL de THF seco se le añaden, a 0 °C, 1,80 mL (16,29 mmol) de TiCl₄ y se mantiene en agitación hasta alcanzar temperatura ambiente. A continuación, se aumenta la temperatura hasta 66 °C y se adicionan lentamente 570 mg (1,39 mmol) del dialdehído **83** disueltos en 100 mL de THF seco. La reacción se mantiene a reflujo y bajo atmósfera de argón durante 5 h, tras las cuales la mezcla de reacción se vierte sobre una mezcla de AcOEt y HCl 2N, se extrae y se lava con agua saturada de NaCl hasta pH neutro de las aguas de lavado, se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad, obteniéndose 680 mg de producto bruto. Después de cromatografiar en columna de gel de sílice (eluyente Hex/AcOEt 9/1), se obtienen 150 mg (29%) de olefina **86**, 108 mg (18%) del diol *cis* **87** y 16 mg (3%) del diol *trans* **88**.

Obtención del diacetato de (*cis*)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo [17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (90).



Seguendo el método J, a una disolución de 97 mg (0,25 mmol) de **85** en 4,0 mL de piridina se añaden 2,0 mL de Ac₂O. Después de 22 horas, se obtienen 86 mg (73%) del producto acetilado **90**.

Diacetato de (*cis*)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (90):

IR: 1742, 1594, 1266 cm⁻¹.

RMN ¹H: Tabla IV (Fig. LXXIIIa).

RMN ¹³C: Tabla V (Fig. LXXIIIb).

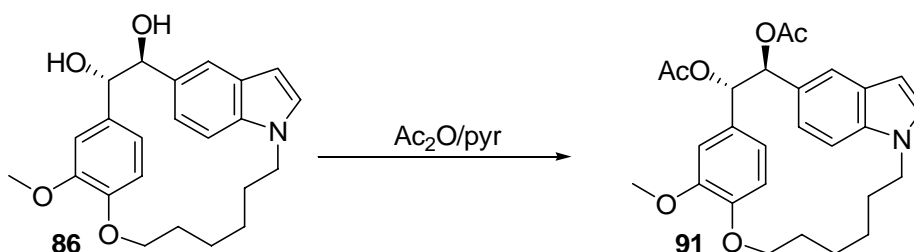
EM: 465 (M⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 16,55 min.

 Columna C₈ t_R: 15,14 min.

 Columna fenólica t_R: 16,03 min.

Obtención del diacetato de (*trans*)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo [17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (91).



Seguendo el método J, a una disolución de 72 mg (0,19 mmol) de **86** en 4,0 mL de piridina se añaden 2,0 mL de Ac₂O. Después de 24 horas, se obtienen 52 mg (59%) del diacetato **91**.

Diacetato de (trans)-20-metoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (91):

IR: 1740, 1603, 1266 cm⁻¹.

RMN ¹H: Tabla IV (Fig. LXXIVa).

RMN ¹³C: Tabla V (Fig. LXXIVb).

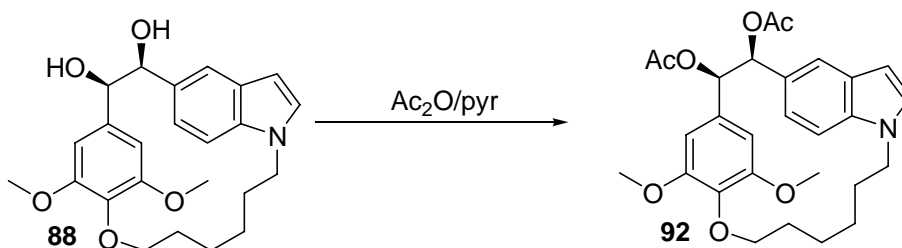
EM: 465 (M⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 16,22 min.

Columna C₈ t_R: 14,92 min.

Columna fenólica t_R: 15,99 min.

Obtención del diacetato de (cis)-20,23-dimetoxi-18-oxa-11-azatetraciclo [17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (92).



Seguendo el método J, a una disolución de 30 mg (0,07 mmol) de **88** en 3 mL de piridina se añaden 1,5 mL de Ac₂O y se mantiene en agitación 24 horas. Tras cromatografiar el crudo de reacción, se obtienen 11 mg (32%) del producto acetilado **92**.

Diacetato de (cis)-20,23-dimetoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa-1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (92):

IR: 1742, 1589, 1236, 1126 cm⁻¹.

RMN ¹H: Tabla VII (Fig. LXXVa).

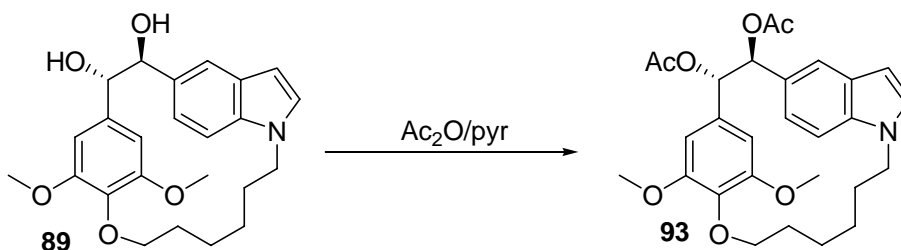
EM: 495 (M⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 15,88 min.

Columna C₈ t_R: 14,88 min.

Columna fenólica t_R: 15,70 min.

Obtención del diacetato de (*trans*)-20,23-dimetoxi-18-oxa-11-azatetraciclo [17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa -1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (93).



Siguiendo el método J, a una disolución de 23 mg (0,06 mmol) de **89** en 3 mL de piridina se añaden 1,5 mL de Ac₂O y se mantiene en agitación 20 horas. Tras cromatografiar el crudo de reacción, se obtienen 9 mg (30%) del producto acetilado **93**.

Diacetato de (*trans*)-20,23-dimetoxi-18-oxa-11-azatetraciclo[17.2.2.1^{4,8}.0^{7,11}]tetracosa -1(21),4(24),5,7,9,19,22-heptaeno-2,3-diol (93):

IR: 1738, 1592, 1266 cm⁻¹.

RMN ¹H: Tabla VII (Fig. LXXVIa).

RMN ¹³C: Tabla VIII (Fig. LXXVIb).

EM: 495 (M⁺).

HPLC: Columna C₁₈ t_R: 16,29 min.

 Columna C₈ t_R: 15,12 min.

 Columna fenólica t_R: 15,74 min.

IV.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE POLIMERIZACIÓN DE TUBULINA.

La parte experimental de la tubulina se ha dividido en tres apartados:

- **Aislamiento de la proteína microtubular** a partir de cerebros de ternero.
- **Ensayos de inhibición de polimerización de tubulina**, en el cual se hace un cribado con el fin de seleccionar los compuestos que den mejores resultados.
- **Determinación de la IC₅₀**, de los compuestos seleccionados en el apartado anterior.

IV.5.A. Aislamiento de proteína microtubular.

Se parte de 4 cerebros de ternero recién sacrificados, se enfrían a 0 °C en disolución de transporte (DT) y se llevan a una cámara fría donde se eliminan manualmente las meninges y los coágulos. La parte superficial del córtex se corta tomando la sustancia gris y evitando, en lo posible, coger la sustancia blanca. Se obtienen aproximadamente 300 gramos de tejido.

Por cada gramo de córtex obtenido se añade 1 mL de disolución de extracción (DE). A continuación, se homogeniza en varias etapas, con un homogenizador potter. El resultado son unos 450 mL de homogenado, con aspecto rosado uniforme, que se centrifuga a 4 °C y 31000 rpm durante 1 hora.

Al sobrenadante, 240 mL, se añaden 24 mL de tampón 10XAB (1/10 del volumen de sobrenadante), 68,9 mL de glicerol (hasta concentración 3,5 M), 1,7 mL de GTP (hasta concentración 0,5 mM) y 1013 µl de PMSF (hasta concentración 1 mM). Los 335 mL resultantes se incuban a 37 °C durante 45 minutos y después se somete a centrifugación a 37 °C durante 90 minutos a 31000 rpm.

El precipitado obtenido (primer ciclo de proteína polimerizada) se resuspende en 12 mL de tampón 1XAB y 1mM GTP y se homogeniza la muestra. La suspensión se enfría en hielo durante 30 minutos, y posteriormente se centrifuga a 32000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Al sobrenadante obtenido (primer ciclo de polimerización/despolimerización de tubulina), 17 mL, se le añaden 85 µl de GTP (hasta 0,5 mM), 51,5 µl de PMSF (hasta 1 mM) y la mezcla se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Después se centrifuga a 32000 rpm durante 45 minutos y a 37 °C. Se recoge el precipitado y se enfría en hielo durante 5 minutos (segunda polimerización). El precipitado se resuspende con 2 mL de tampón 1XAB y 10µl de GTP (0,5 mM).

Las muestras fueron alicuotadas en volúmenes de 200 µl (obteniéndose un volumen total entre 3,0 y 4,0 mL y una concentración media de 35 mg/mL), almacenadas a -80°C, previa congelación rápida con nitrógeno líquido, hasta su posterior uso.

El rendimiento promedio de cada purificación (utilizando como material de partida 300 g de tejido) fue de 0,3-0,5 mg de proteína microtubular (MTP) por gramo de tejido.

IV.5.B. Determinación de la actividad inhibitoria de la polimerización de tubulina de los compuestos a una concentración.

Las alícuotas de proteína microtubular (MTP) se descongelan rápidamente en un baño de agua a 20 °C y se resuspenden en 1 mL de tampón 1X AB por alícuota. La suspensión se somete, cuidadosamente, a agitación magnética suave en hielo durante 30 minutos, se centrifuga 30 minutos a 4 °C y 100000 x g (segundo ciclo completo de polimerización/despolimerización). Se recoge el sobrenadante y se realiza el ensayo de Bradford para determinar la concentración de proteína total; típicamente 4,0 mg/mL (valor medio por preparación). Para esta concentración de proteína, se toman 125 µl de MTP, 5 µl de disolución 2 mM de los ligandos en DMSO (para una concentración de compuesto 20 µM), 15 µL de DMSO y 355 µl de tampón (1XAB + 1,5 mM GTP), hasta completar los 500 µL del volumen final.

Las muestras se incuban a 20 °C durante 30 minutos, permitiendo la interacción de los ligandos con la proteína microtubular. A continuación, se enfrían en un baño de hielo durante 10 minutos y se introducen en el espectrofotómetro. La absorbancia se registra a 450 nm durante todo el proceso. Tras un período de estabilización a 4 °C, aproximadamente 5 minutos, la temperatura se eleva a 37 °C. Cuando la absorbancia se estabiliza, cerca de los 45 min., se vuelve a cambiar la temperatura a 4 °C y la absorbancia vuelve a disminuir.

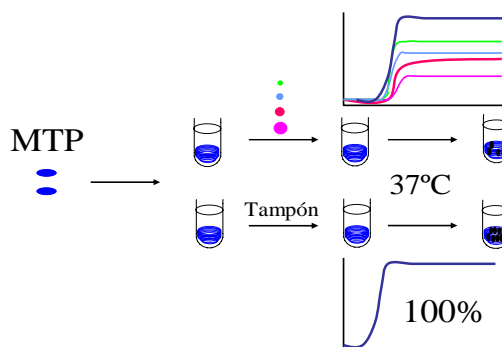


Figura 113. Esquema de ensayo de inhibición de polimerización de tubulina. Cada cubeta contiene proteína microtubular en tampón a concentración de 1 mg/mL, y DMSO (4%). En cada cubeta se añade el compuesto que se quiere ensayar, a la concentración elegida, exceptuando la cubeta de referencia. A continuación, se aumenta la temperatura (37 °C) y se mide la turbidez generada. La diferencia entre la absorbancia presentada por la muestra de referencia (línea azul oscura, valor considerado como el 100% de polimerización) y cada una de las muestras que contienen compuesto (resto de líneas de colores) se corresponde con la inhibición que ejerce ese compuesto (%) a la concentración ensayada.

En las siguientes tablas se resumen los ensayos de inhibición de polimerización de tubulina y se indican la concentración probada y el porcentaje de inhibición producida. Todos los resultados son para una concentración final de proteína de 1 mg/mL.

COMPUESTO	CONC (μ M)	INHIBICIÓN (%)	COMPUESTO	CONC (μ M)	INHIBICIÓN (%)
C-A4	3-4	50	C-A4	3-4	50
19	20	20	59	20	97
20	20	52	60	20	98
22	20	12	61	20	95
23	5	81	62	20	32
24	20	61	63	20	87
25	20	86	64	20	95
26	20	0	65	5	97
27	20	5	66	20	40
30	20	94	67	-	-
32	20	86	68	5	0
34	20	7	69	20	2
35	20	16	70	20	22
37	-	-	71	20	37
38	20	12	72	20	37
39	20	32	73	20	0
43	20	86	74	20	0
44	20	68	75	20	95
45	20	98	77	20	98
46	20	61	78	20	91
47	20	96	79Z y 80Z	20	93
48	5	85	79E y 80E	20	49
49	20	100	84	20	19
50	20	96/88	85	40	0
51	20	32	86	40	0
52	20	90	87	20	44
53	20	93	88	40	0
54	5	93	89	40	0
55	20	96	90	40	18
56	20	12	91	40	0
57	20	9	92	40	0
58	20	100	93	40	0

Tabla 27. Inhibición (%) de los compuestos ensayados a 5, 20 ó 40 μ M. En negrita se resaltan aquellos compuestos que presentan un valor de IPT mayor del 50% para la concentración de prueba (5, 20 o 40 μ M).

IV.5.C. Determinación de la IC₅₀ de inhibición de polimerización de tubulina.

La IC₅₀ es la concentración a la cual el compuesto inhibe el 50% de la polimerización. La determinación se lleva a cabo gráficamente.

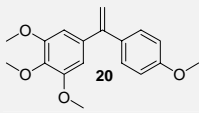
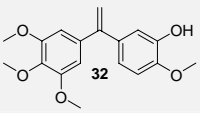
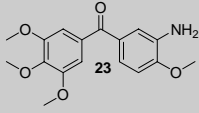
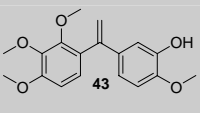
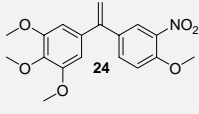
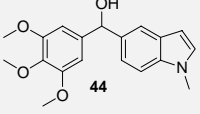
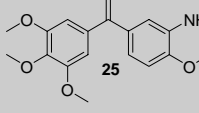
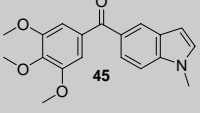
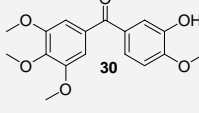
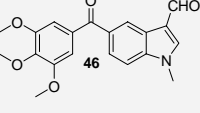
Los compuestos seleccionados para la determinación de la IC₅₀ fueron aquellos que, a una concentración 20 µM o menor, presentaban una inhibición de la polimerización de la tubulina superior al 50% (marcados en negrita en la tabla).

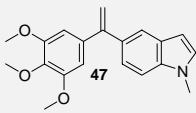
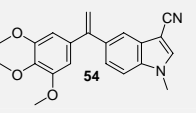
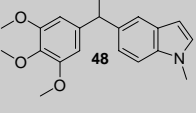
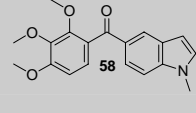
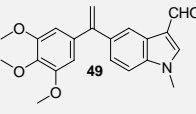
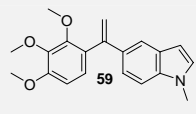
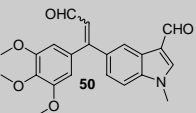
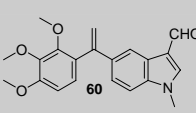
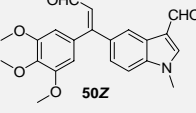
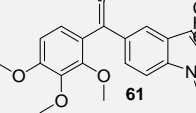
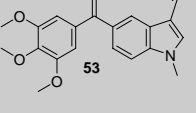
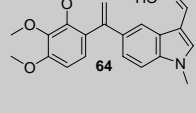
El procedimiento seguido es exactamente igual al explicado anteriormente, pero se mide simultáneamente la inhibición de polimerización de tubulina de varias concentraciones del ligando a una concentración fija de proteína (1 mg/mL). En primer lugar y tras descongelar las alícuotas, se procede al segundo ciclo de despolimerización y se determina, mediante el método de Bradford, la concentración de proteína tras el segundo ciclo de despolimerización.

A continuación, se preparan las cubetas, utilizando distintas concentraciones del mismo compuesto en cada una (generalmente se utilizan al menos las concentraciones 0,5, 1, 2, 5, 7 y 10 µM, aunque varían en función del comportamiento de cada compuesto), DMSO hasta 20 µL, 125 µl de MTP (4 mg/mL) y 355 µl de tampón (1XAB + 1,5 mM GTP).

Tras la preparación de las muestras, la incubación y el resto del proceso se repite del mismo modo que en el ensayo preliminar del apartado anterior.

Como se ha indicado anteriormente, una vez seleccionados los compuestos que mejores resultados de actividad dieron, se calculó la IC₅₀ de estos compuestos, a partir del porcentaje de inhibición de polimerización de tubulina que mostraban a las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla:

COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)	COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)
 20	5	23	 32	0,5	44
	7	25		1	48
	10	35		1,5	70
	15	36		2	83
	20	52		3	86
	30	68		5	90
 23	0,5	30	 43	2	14
	1	39		5	25
	2	61		7	20
	3	69		8	30
	5	81		10	42
	-	-		15	61
	-	-		20	86
 24	2	0	 44	1	26
	4	18		10	42
	5	29		15	51
	10	48		20	68
	12	54		30	81
	15	75		-	-
 25	0,5	30	 45	1	22
	1	33		5	29; 30
	1,5	36		10	43; 56
	2	43		15	52
	5	65		20	78; 84
	7	91		30	98
	10	93		-	-
 30	0,5	9	 46	-	-
	1	28		5	22
	1,5	34		10	35
	2	54		15	37
	5	63		20	61
	7	85		-	-
10	96	-	-		

COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)	COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)
	1	65		0,5	28
	5	94		1	43
	10	96		1,5	45
	15	96		2	75
	20	96		4	100
	30	100		5	93
	-	-		-	0,1
	0,5	35		0,3	58
	1	52		0,5	73
	2	65		0,7	77
	5	85		1	95
	-	-		10	96
	-	-		-	-
	0,1	0		1	8
	0,2	27		2,5	18
	0,5	34		5	40
	1	39		10	90
	2	91		20	97
	5	100		-	-
	10	100		-	-
	3	26		0,5	0
	4	29		2	21
	5	52; 68		4	40
	7	32; 52; 81		5	61
	10	45		7	78
	15	68		10	92
	20	88		20	98
	-	-		-	-
	1	16		3	40
	2	30		5	59
	4	43		7	63
	5	71		10	83
	7	75		20	95
	20	96		-	-
	-	-		-	-
	0,5	17		1	16
	1	26		2	29
	2	38		3	27
	3	50		4	33
	4	62		5	52
	5	89		6	88
	20	93		7	98
	-	-		-	-

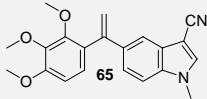
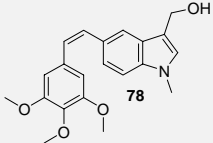
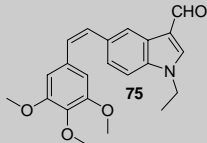
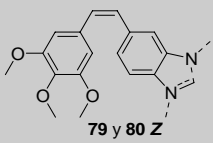
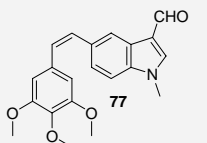
COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)	COMPUESTO	CONC (μM)	INHIBICIÓN (%)
 65	0,5	17	 78	0,1	14
	1	24		0,2	29
	2	40		0,5	39
	3	51		1	32
	4	73		2	66
	5	97		5	91
	-	-		7	94
 75	0,1	6	 79 y 80 Z	1	33
	1	30		2	41
	2	79		3	65
	5	92		4	58
	10	94		5	84
	20	95		7	94
 77	0,5	55			
	1	85			
	2	89			
	5	94			
	20	98			

Tabla 28. Inhibición (%) a varias concentraciones de los compuestos seleccionados para determinar su IC_{50} .

V. CONCLUSIONES

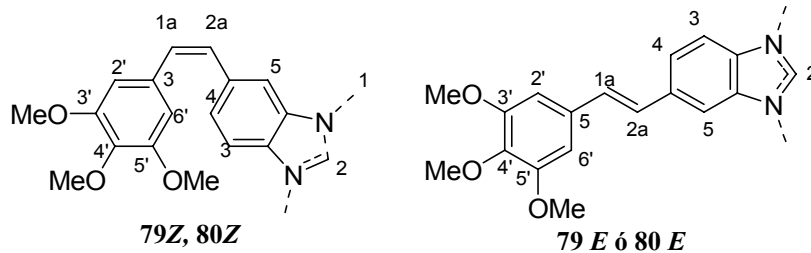
Durante la realización de este trabajo de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación de nuevos agentes antimitóticos relacionados con combretastatinas y fenstatinas y de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La metodología sintética utilizada permite obtener fácilmente fenstatinas, isocombretastatinas y un gran número de derivados que constituyen una nueva familia de agentes antimitóticos.
2. Se han obtenido decenas de compuestos que combinan restos trimetoxifenilo con restos indolilo a través de puentes diferentes. Su ensayo como inhibidores de la polimerización de tubulina ha permitido la comparación directa de combretastatinas, fenstatinas e isocombretastatinas, que suelen poseer una elevada potencia en dicho ensayo y como agentes citotóxicas cuando poseen las agrupaciones citadas.
3. Para similares potencias de inhibición de polimerización de tubulina, las isocombretastatinas presentan mayor potencia citotóxica que las fenstatinas y semejante a la mostrada por las combretastatinas.

4. El esqueleto de *N*-metil-5-indolilo ha resultado ser un buen reemplazo del anillo de guayacol, o anillo Ar₂, tanto en isocombretastatinas como combretastatinas y fenstatinas. Sin embargo, su sustitución por otros heterociclos benzofusionados relacionados, como 1,3-benzoxazol y 1*H*benzimidazol, conduce a compuestos menos activos o inactivos.
5. La presencia del resto 3,4,5-trimetoxifenilo conduce a compuestos más potentes que la presencia del resto 2,3,4-trimetoxifenilo. Sin embargo, la potencia de los compuestos con éste último se ve incrementada cuando se combina con un anillo indólico (en lugar de un segundo resto fenilo).
6. En isocombretastatinas, las modificaciones introducidas en la posición C-3 del indol no han mejorado la actividad presentada por el compuesto con el resto indolilo sin sustituir en dicha posición, aunque la introducción de una oxima, un grupo nitrilo o un grupo formilo ha generado compuestos de potencias comparables.
7. Siguiendo la metodología empleada por el grupo de investigación en trabajos anteriores, se han sintetizado dos nuevas familias de combretastatinas macrocíclicas, cuyo análisis conformacional completa el estudio sobre la movilidad y la disposición que adoptan este tipo de análogos.
8. Se ha confirmado que la existencia de un puente adicional (espaciador), conectando las posiciones *para-para* de combretastatinas y análogos, hace perder la actividad inhibitoria de polimerización de tubulina y la citotoxicidad de estas familias de compuestos.

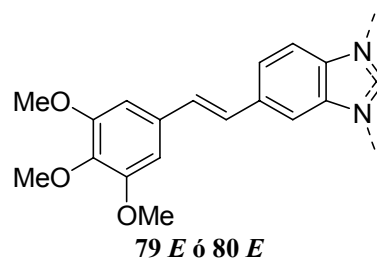
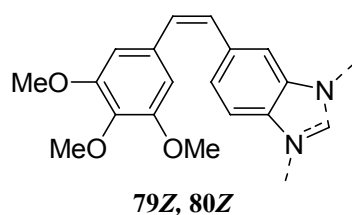
VI. TABLAS Y ESPECTROS

VI.1. TABLAS.



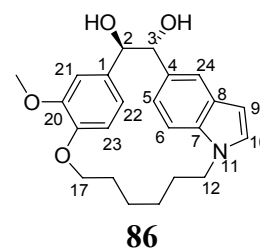
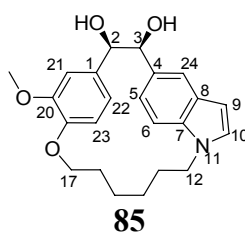
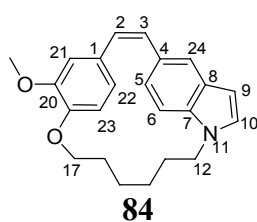
¹ H	Mayoritario 70%	Minoritario 30%	
2	7,83 <i>s</i>	7,75 <i>s</i>	7,85 <i>s</i>
3	7,22 <i>d</i> 8,6	7,29 <i>d</i> 8,6	7,75 <i>d</i> , 8,4
4	7,66 <i>d</i> 8,6	7,65 <i>m</i>	7,49 <i>dd</i> , 8,4; 1,8
5	7,29 <i>s</i>	7,27 <i>s</i>	7,47 <i>sa</i>
1 ^a	6,72 <i>d</i> 12,1	6,71 <i>d</i> 12,1	7,16 <i>d</i> 16,4
2 ^a	6,52 <i>d</i> 12,1	6,50 <i>d</i> 12,1	7,05 <i>d</i> 16,4
2', 6'	6,49 <i>s</i>	6,50 <i>s</i>	6,76 <i>s</i>
NCH ₃	3,74 <i>s</i>	3,81 <i>s</i>	3,87 <i>s</i>
OCH ₃ -C _{3'} OCH ₃ -C _{5'}	3,60 <i>s</i>	3,61 <i>s</i>	3,92, <i>s</i>
OCH ₃ -C _{4'}	3,82 <i>s</i>	3,83 <i>s</i>	3,84 <i>s</i>

Tabla I. Señales espectroscópicas de RMN ¹H de los compuestos **79** y **80**.



¹³ C	Mayoritario 70%	Minoritario 30%	
C	131,6	No observado	132,8
	132,3	No observado	133,3
	132,6	No observado	135,1
	132,8	No observado	137,9
	137,2	No observado	143,4
CH	152,8 (2)	153,4 (2)	153,5 (2)
	106,0 (2)	106,0 (2)	106,1 (2)
	109,6	108,8	107,4
	119,8	120,7	120,2
	123,7	124,4	121,2
	129,6	129,1	128,0
CH₃	130,2	130,3	128,6
	144,1	144,0	No observado
	30,9	31,1	31,2
	55,8 (2)	56,1 (2)	56,2
	60,9	60,9	61,0

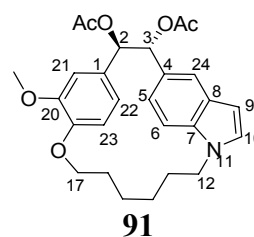
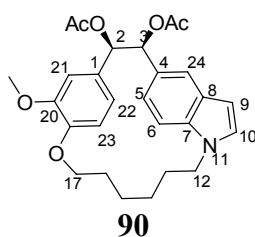
Tabla II. Señales espectroscópicas de RMN ¹³C de los compuestos **79** y **80**.



¹ H		Mayoritario	Minoritario	
		60%	40%	
2	6,92 <i>d</i> 10,2	5,25 <i>d</i> [‡]	5,36 <i>d</i> [‡]	4,73 <i>d</i> 7,8
3	7,14 <i>d</i> 10,2	4,91 <i>d</i> [‡]	4,82 <i>d</i> [‡]	4,66 <i>d</i> 7,8
5	6,38 <i>dd</i> 7,9; 1,8	6,15 <i>m</i> [‡]	6,15 <i>m</i> [‡]	6,24 <i>bd</i> 8,1
6	6,83 <i>d</i> 7,9	6,77 <i>d</i> [‡]	6,77 <i>d</i> [‡]	6,78 <i>d</i> 8,1
9	6,40 <i>d</i> 2,7	6,3-6,5 <i>m</i> [‡]	6,3-6,5 <i>m</i> [‡]	6,43 <i>d</i> 2,7
10	6,96 <i>d</i> 2,7	6,97 <i>m</i> [‡]	6,97 <i>m</i> [‡]	6,98 <i>d</i> 2,7
12	4,05 <i>t</i> 6,2	3,7-4,2 <i>m</i>	3,7-4,2 <i>m</i>	4,10 <i>m</i>
13	1,62 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
14	0,93 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
15	1,18 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
16	1,33 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
17	3,98 <i>t</i> 7,7	3,7-4,2 <i>m</i>	3,7-4,2 <i>m</i>	3,6-4,2 <i>m</i>
21	6,44 <i>sa</i>	6,2-6,4 <i>m</i> [‡]	6,7-6,8 <i>m</i> [‡]	5,80-6,90 <i>m</i>
22	6,25 <i>dd</i> 8,1;1,8	No observado	No observado	5,80-6,90 <i>m</i>
23	6,47 <i>d</i> 8,1	No observado	No observado	5,80-6,90 <i>m</i>
24	7,40 <i>s</i>	7,76 <i>sa</i> [‡]	7,41 <i>sa</i> [‡]	7,65 <i>s</i>
OCH₃-C₂₀	3,55 <i>s</i>	No observado (ancho)	No observado (ancho)	3,76 <i>sa</i>

[‡]Señales poco resueltas

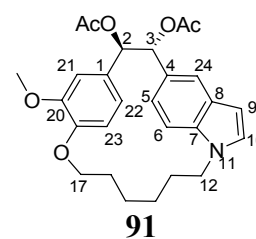
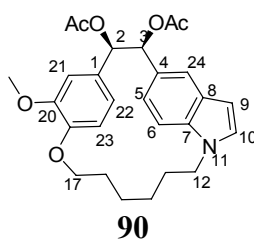
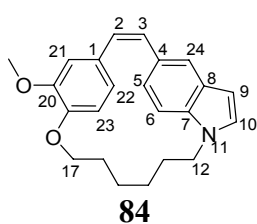
Tabla III. Señales espectroscópicas de RMN ¹H de los compuestos **84**, **85** y **86**.



¹ H	Mayoritario 55%	Minoritario 45%	~50%	~50%
2	5,99 <i>d</i> 4,5	5,99 <i>d</i> 4,5	6,08 <i>d</i> 7,9	5,99 <i>d</i> 8,0
3	6,60 <i>d</i> 4,5	6,60 <i>d</i> 4,5	6,27 <i>d</i> 7,9	6,07 <i>d</i> 8,0
5	No observado	No observado	6,48 <i>d</i> 8,1	6,19 <i>d</i> 8,1
6	6,79-6,85 <i>m</i>	6,79-6,85 <i>m</i>	6,83* <i>d</i> 8,1	6,79* <i>d</i> 8,1
9	6,46 <i>sa</i>	6,39 <i>sa</i>	6,40 <i>da</i>	6,40 <i>da</i>
10	7,00 <i>sa</i>	6,98 <i>sa</i>	6,96 <i>d</i> 3,0	6,90 <i>d</i> 3,0
12	3,6-4,2 <i>m</i>	3,6-4,2 <i>m</i>	3,6-4,3 <i>m</i>	3,6-4,3 <i>m</i>
13	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
14	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
15	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
16	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
17	3,6-4,2 <i>m</i>	3,6-4,2 <i>m</i>	3,6-4,3 <i>m</i>	3,6-4,3 <i>m</i>
21	6,47 <i>sa</i>	5,88 <i>sa</i>	5,93 <i>sa</i>	6,87 <i>sa</i>
22	6,26 <i>m</i>	6,26 <i>m</i>	6,84 <i>dd</i> 8,4; 1,3	5,97 <i>dd</i> 8,4; 1,5
23	6,79-6,85 <i>m</i>	6,79-6,85 <i>m</i>	6,71 <i>d</i> 8,4	6,46 <i>d</i> 8,4
24	7,74 <i>sa</i>	7,39 <i>sa</i>	7,58 <i>sa</i>	7,58 <i>sa</i>
OCH ₃ -C ₂₀	3,85 <i>sa</i>	3,10 <i>sa</i>	3,89 <i>s</i>	3,10 <i>s</i>
AcO	2,30 <i>s</i> ; 2,14 <i>s</i>	2,32 <i>s</i> ; 2,14 <i>s</i>	2,13 <i>s</i> ; 2,13* <i>s</i>	2,13 <i>s</i> ; 2,04*3 <i>s</i>

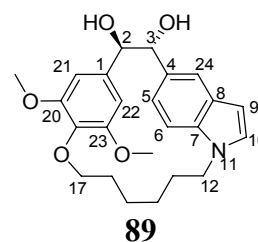
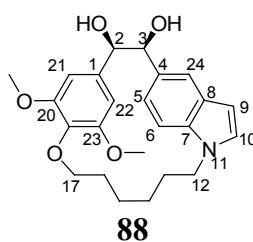
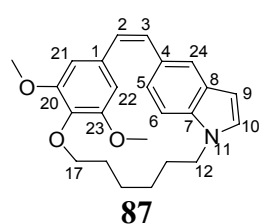
* Señales intercambiables.

Tabla IV. Señales espectroscópicas de RMN ¹H de los compuestos **90** y **91**.



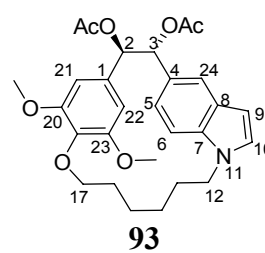
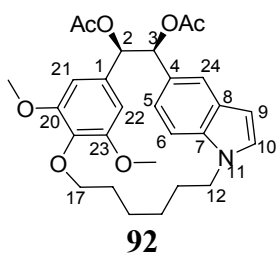
¹³ C		Mayoritario 55%	Minoritario 45%	~50%	~50%
1	133,6	129,9	129,8	131,0	129,7
2	132,9	73,7	74,5	79,5	79,5
3	134,8	77,4	77,0	79,2	78,7
4	129,8	No observado	No observado	128,8	128,4
5	124,6	122,8	122,8	122,9	122,9
6	109,2	109,6	109,6	108,9	109,8
7	135,0	135,6	135,6	136,2	135,7
8	128,2	127,9	127,9	127,5	127,3
9	101,0	101,0	101,2	101,1	101,0
10	128,2	128,5	128,5	128,5	129,1
12	46,1	46,0	46,0	46,1	46,2
13	29,5	31,8	31,8	32,4	33,5
14	25,9	29,6	29,6	29,5	29,6
15	23,2	27,6	27,6	27,9	26,5
16	27,2	27,8	27,8	26,5	27,2
17	70,3	70,2	69,9	69,0	69,8
19	144,9	No observado	No observado	148,1	147,0
20	150,3	No observado	No observado	150,2	150,5
21	113,9	108,9	108,6	115,6	113,6
22	122,5	119,5	119,3	122,4	120,1
23	117,9	118,7	118,6	118,4	118,7
24	120,5	118,0	118,0	117,9	118,0
OCH ₃ - C ₂₀	55,4	56,3	No observado	55,8	56,1
AcO-		171,1; 170,0 21,1; 21,1	170,0; 170,0 21,1; 21,1	170,4; 170,0 21,2; 21,2	170,4; 170,2 21,2; 21,0

Tabla V. Señales espectroscópicas de RMN ¹³C de los compuestos **84**, **90** y **91**.



¹ H		Mayoritario 65%	Minoritario 35%	
2	6,92 <i>d</i> 10,1	5,17 <i>d</i> 3,8	5,32 <i>sa</i>	4,64 <i>d</i> 8,1
3	7,16 <i>d</i> 10,1	4,87 <i>d</i> 3,8	4,76 <i>sa</i>	4,71 <i>d</i> 8,1
5	6,45 <i>dd</i> 8,2; 1,4	6,18 <i>d</i> 8,8	6,39 <i>d</i> 8,4	6,28 <i>dd</i> 8,4; 1,4
6	6,87 <i>d</i> 8,2	6,83 <i>d</i> 8,8	6,80 <i>d</i> 8,4	6,82 <i>d</i> 8,4
9	6,39 <i>d</i> 3,1	6,44 <i>sa</i>	6,37 <i>sa</i>	6,44 <i>d</i> 2,9
10	6,97 <i>d</i> 3,1	6,98 <i>sa</i>	6,98 <i>sa</i>	6,99 <i>d</i> 2,9
12	4,06 <i>t</i> 5,9	4,10 <i>m</i>	4,10 <i>m</i>	4,08 <i>m</i>
13	1,62 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
14	0,91 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
15	1,24 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
16	1,24 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
17	3,98 <i>t</i> 6,4	3,95 <i>m</i> 3,45 <i>m</i>	3,95 <i>m</i> 3,45 <i>m</i>	4,32 <i>m</i> ; 3,61 <i>m</i>
21	6,05 <i>sa</i>	6,23 <i>sa</i>	6,77 <i>sa</i>	6,66 <i>d</i> 1,6
22	6,05 <i>sa</i>	5,89 <i>sa</i>	5,32 <i>sa</i>	5,37 <i>d</i> 1,6
24	7,40 <i>s</i>	7,79 <i>sa</i>	7,31 <i>sa</i>	7,69 <i>s</i>
OCH ₃ - C ₂₀	3,45 <i>sa</i>	3,81 <i>s</i>	3,86 <i>s</i>	3,86 <i>s</i>
OCH ₃ - C ₂₃	3,45 <i>sa</i>	3,00 <i>s</i>	3,00 <i>s</i>	2,97 <i>s</i>

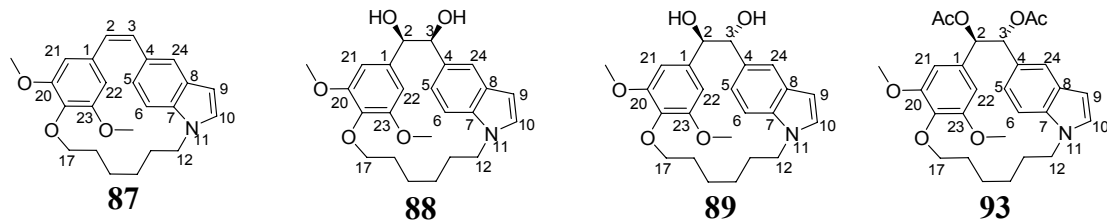
Tabla VI. Señales espectroscópicas de RMN ¹H de los compuestos **87**, **88** y **89**.



¹ H	Mayoritario 60%	Minoritario 40%	
2	6,40 <i>m</i>	6,40 <i>m</i>	5,93 <i>d</i> 8,8
3	6,00 <i>m</i>	5,90 <i>m</i>	6,02 <i>d</i> 8,8
5	6,41 <i>m</i>	6,72 <i>m</i>	6,48 <i>d</i> 8,5
6	6,83 <i>m</i>	6,81 <i>m</i>	6,87 <i>d</i> 8,5
9	6,47 <i>sa</i>	6,30 <i>sa</i>	6,42 <i>d</i> 3,1
10	7,00 <i>sa</i>	7,00 <i>sa</i>	6,99 <i>d</i> 3,1
12	4,10 <i>m</i>	4,10 <i>m</i>	3,95-4,15 <i>m</i>
13	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
14	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
15	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
16	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>	1,1-1,9 <i>m</i>
17	3,90 <i>m</i> 3,60 <i>m</i>	3,90 <i>m</i> 3,60 <i>m</i>	4,21 <i>m</i> 3,62 <i>m</i>
21	6,60 <i>sa</i>	6,73 <i>sa</i>	6,55 <i>d</i> 1,5
22	5,70 <i>sa</i>	5,45 <i>sa</i>	5,67 <i>d</i> 1,5
24	7,80 <i>sa</i>	7,43 <i>sa</i>	7,64 <i>s</i>
OCH₃-C₂₀	3,84 <i>s</i>	3,89 <i>s</i>	3,86 <i>s</i>
OCH₃-C₂₃	3,00 <i>s</i>	3,00 <i>s</i>	3,10 <i>s</i>
AcO-	2,34 <i>s</i> ; 2,14 <i>s</i>	2,31* <i>s</i> ; 2,14 <i>s</i>	2,15* <i>s</i> ; 2,14 <i>s</i>

* Señales intercambiables.

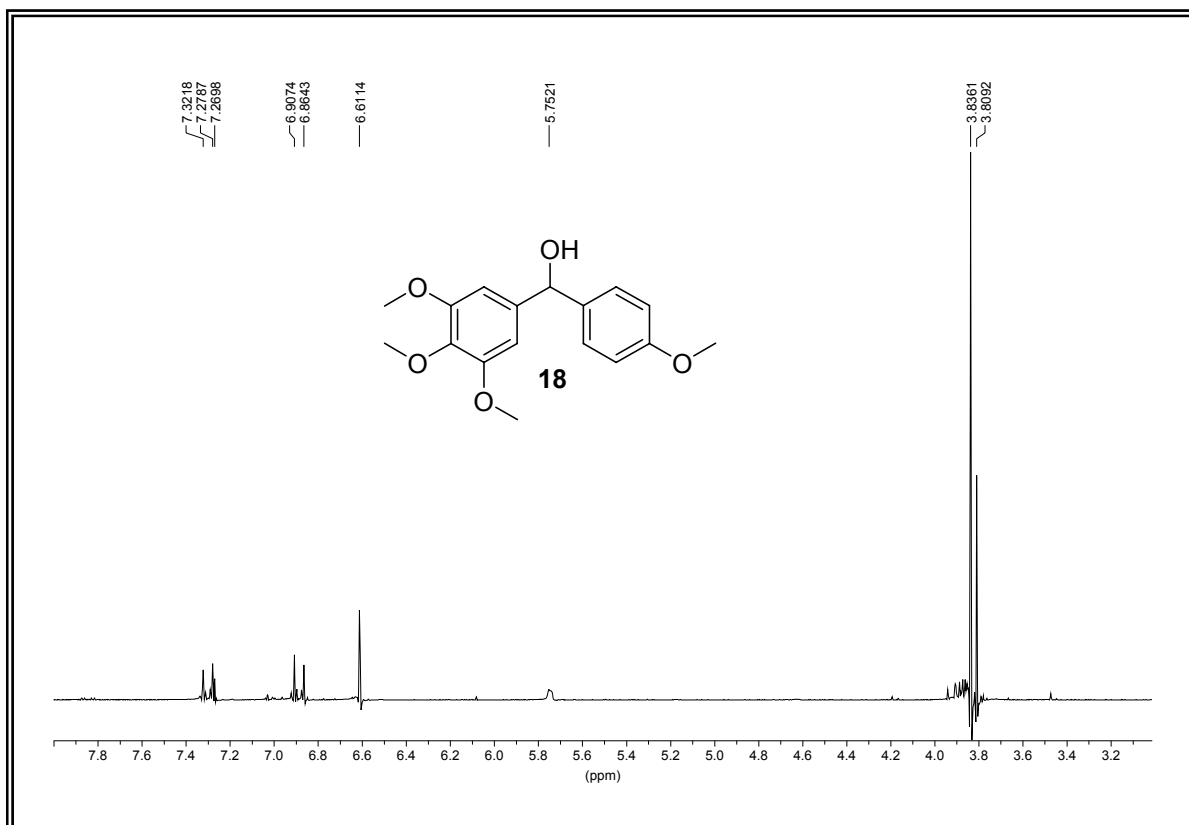
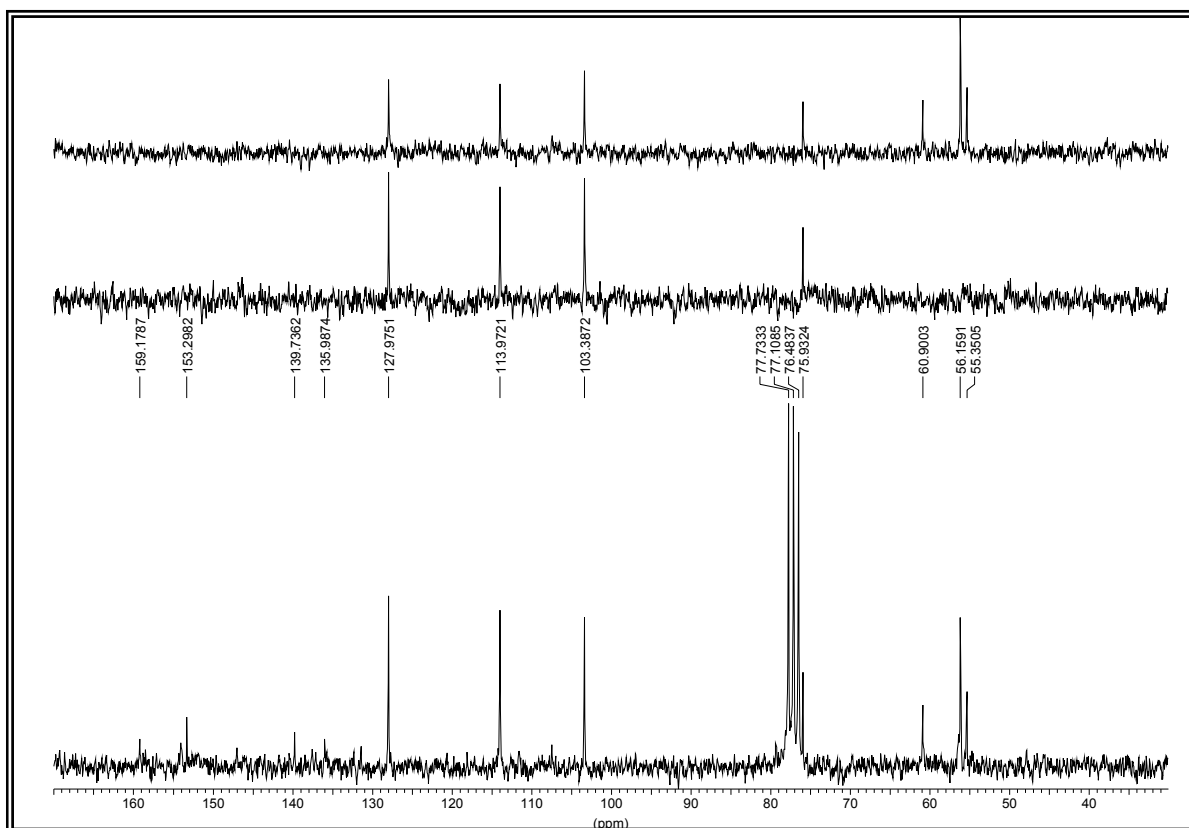
Tabla VII. Señales espectroscópicas de RMN ¹H de los compuestos **92** y **93**.



¹³ C		Mayoritario 65%	Minoritario 35%		
1	134,5	134,5	135,1	134,9	136,1
2	133,4	74,7	75,3	82,6	79,5
3	134,9	77,7	77,7	82,0	79,1
4	129,8	129,8	130,7	130,8	131,4
5	124,2	121,7	124,4	122,1	122,6
6	109,3	108,6	109,5	109,1	109,2
7	135,1	136,0	135,9	136,2	136,6
8	128,0	128,5	129,1	128,6	128,6
9	101,0	101,4	100,6	101,2	101,1
10	128,1	128,1	128,0	128,3	128,7
12	45,7	46,2	46,2	46,2	46,1
13	29,9	31,4	31,4	31,5	31,0
14	26,0	28,6	28,6	28,6	28,4
15	23,4	26,9	26,9	26,7	26,3
16	27,8	23,6	23,6	23,6	23,4
17	71,8	72,2	71,9	72,2	72,2
19	133,9	136,1	135,8	136,3	136,7
20	152,4	152,4	152,4	153,0	153,0
21	107,2	102,7	103,2	102,1	102,7
22	107,2	102,3	105,1	105,7	106,8
23	152,4	152,3	152,0	151,3	151,6
24	120,4	118,1	119,0	117,6	118,6
OCH₃- C₂₀	55,6	56,4	56,2	56,3	56,3
OCH₃- C₂₃	55,6	54,6	54,8	54,7	54,9

Tabla VIII. Señales espectroscópicas de RMN ¹³C de los compuestos **87**, **88**, **89** y **93**.

VI.2. ESPECTROS.

Figura Ia. Espectro de RMN ^1H del compuesto **18**.Figura Ib. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **18**.

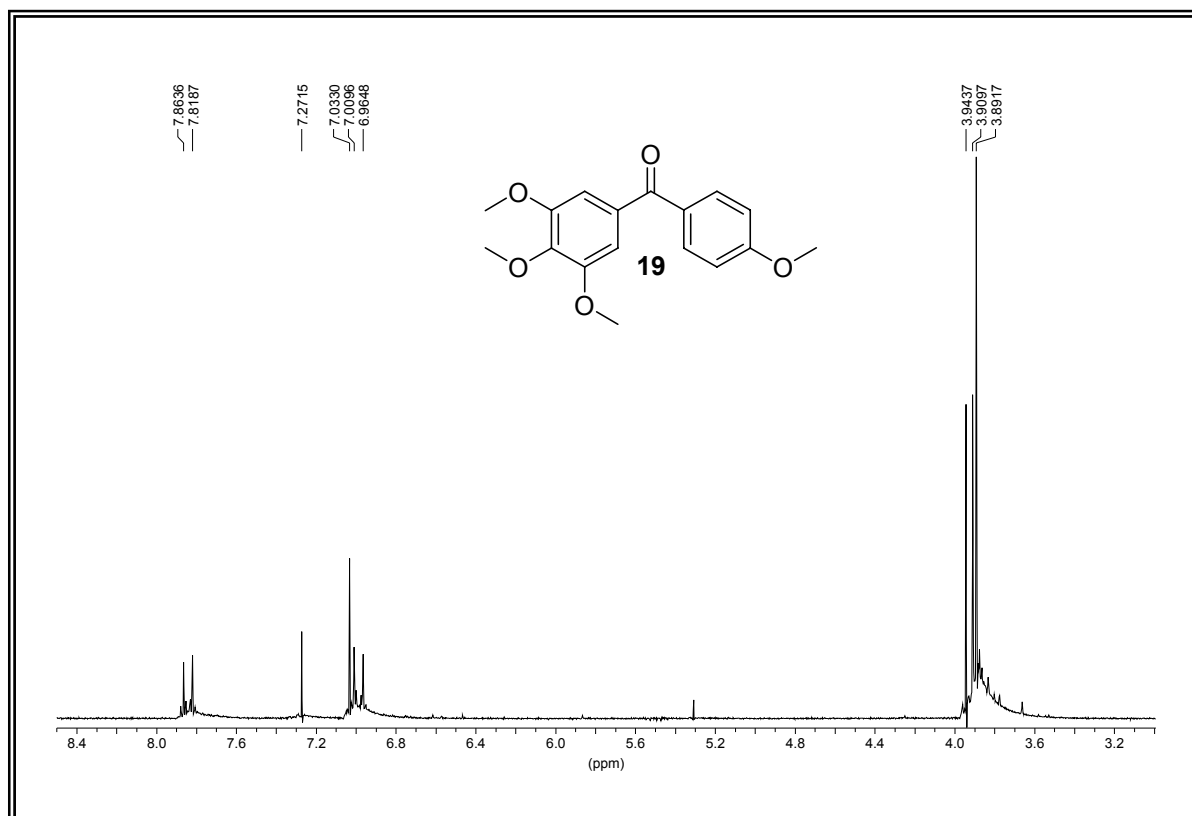


Figura IIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **19**.

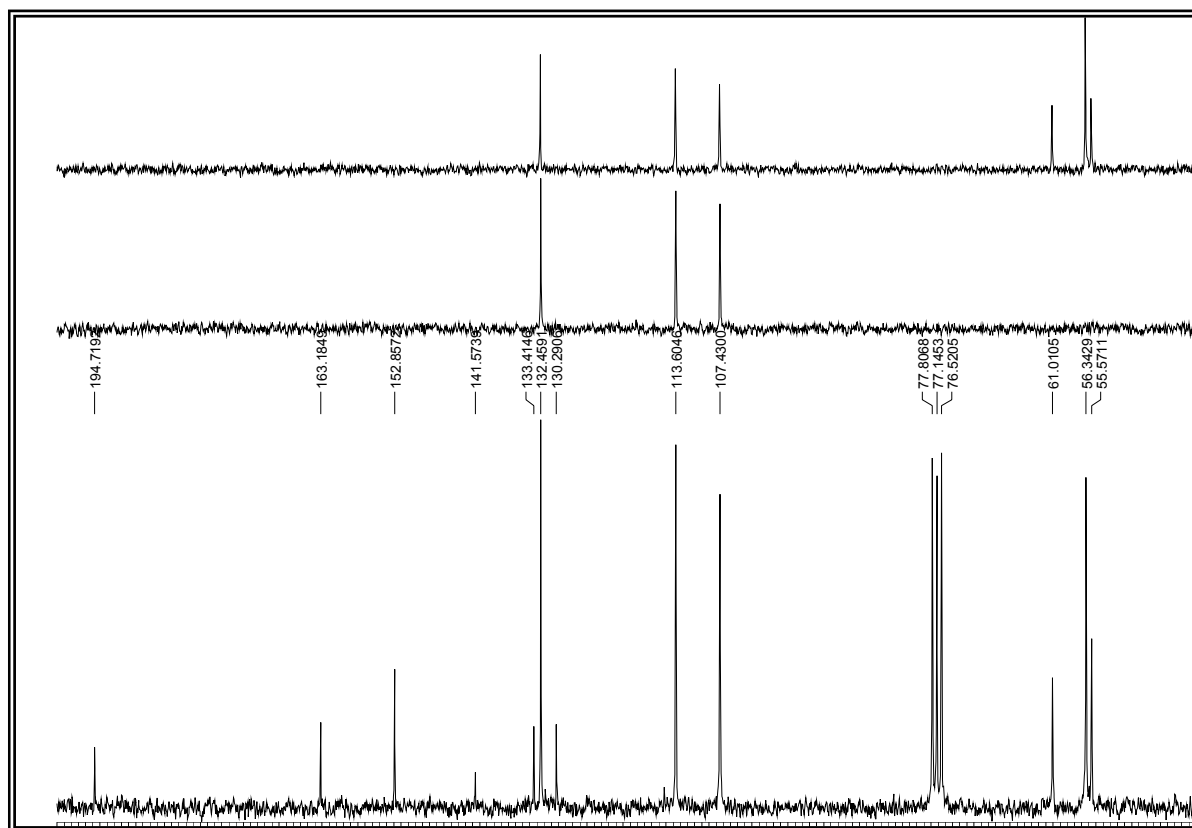


Figura IIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **19**.

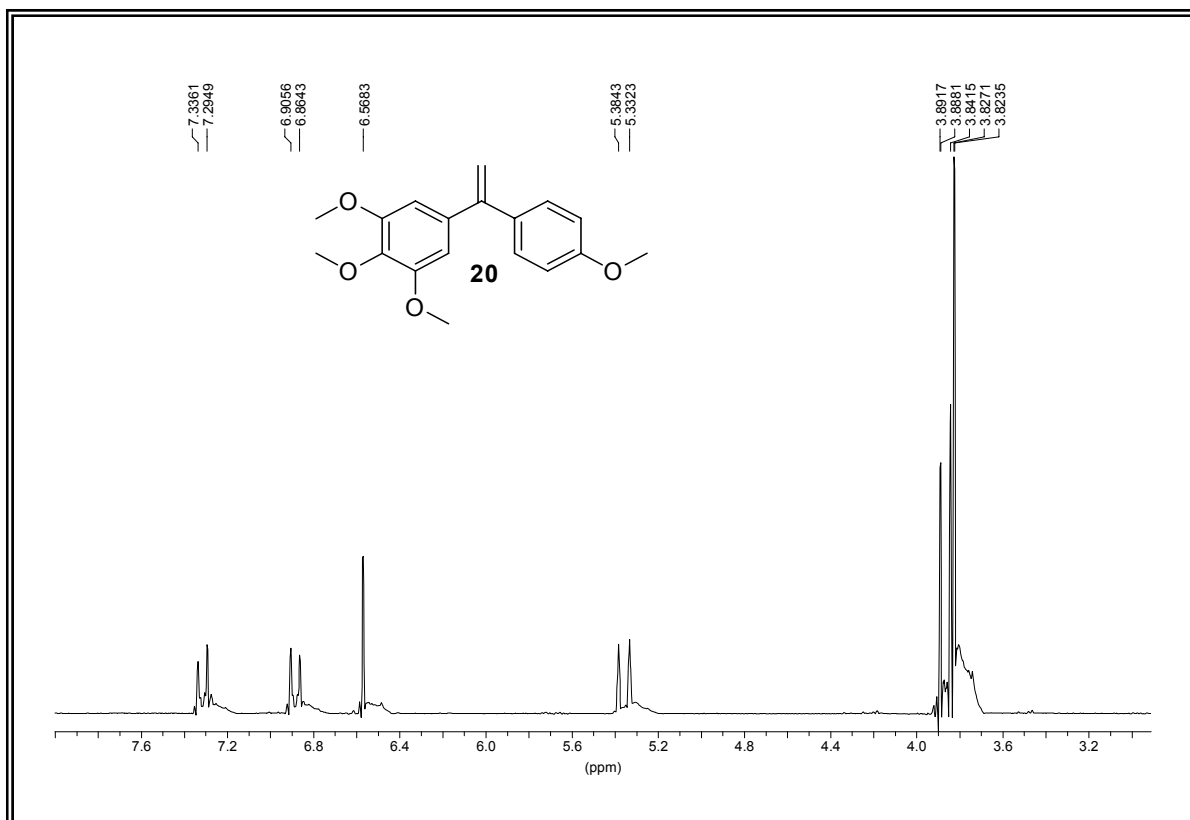


Figura IIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **20**.

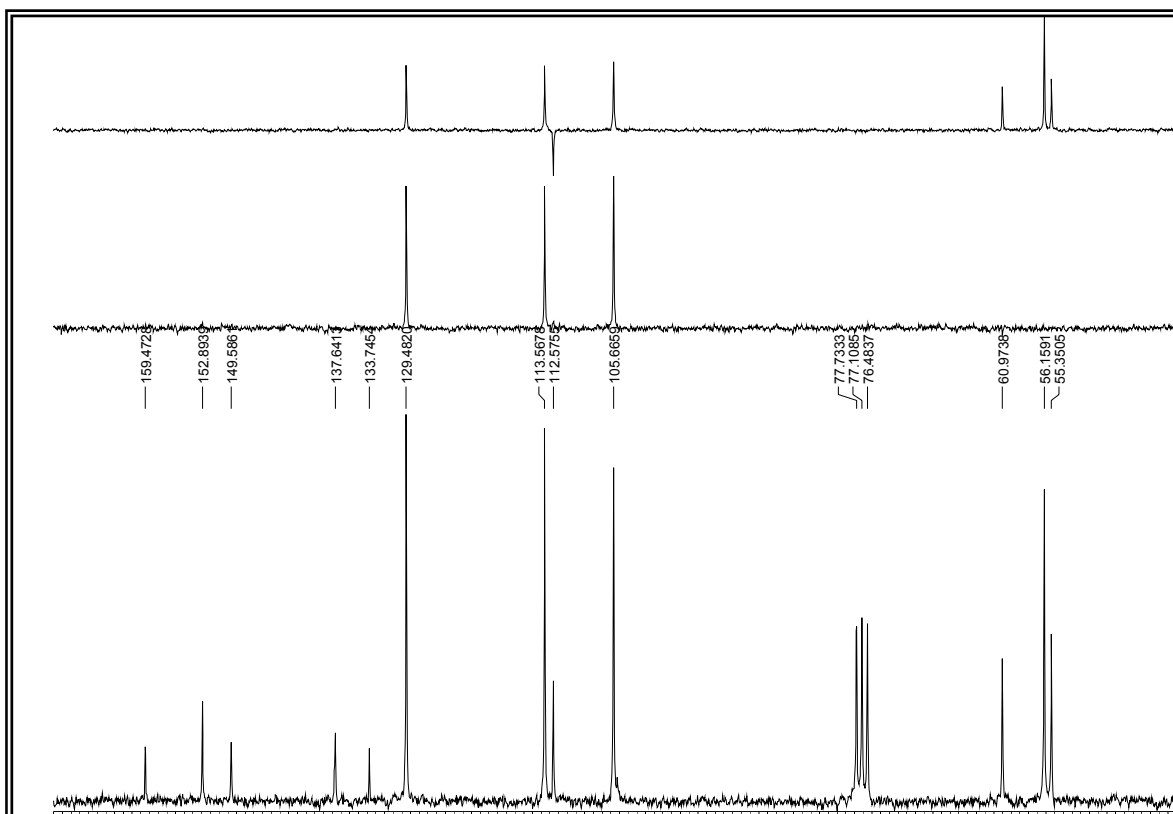


Figura IIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **20**.

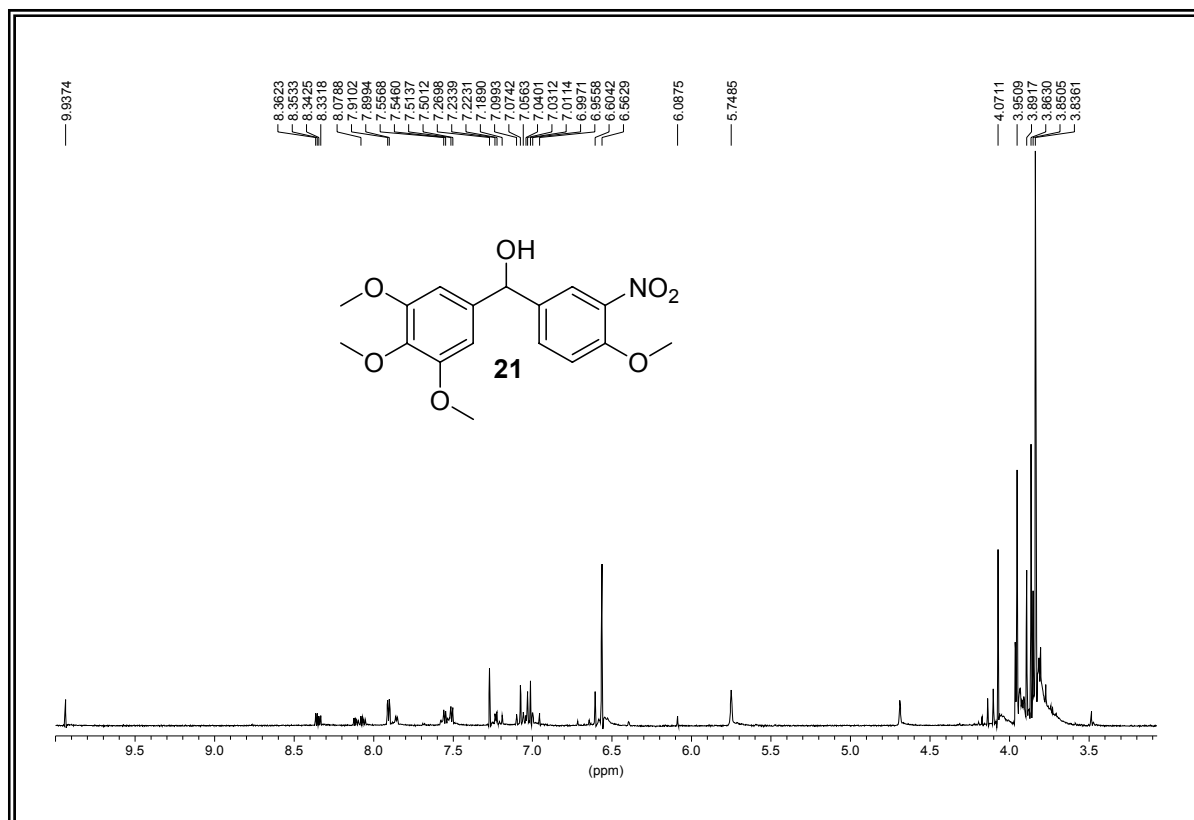
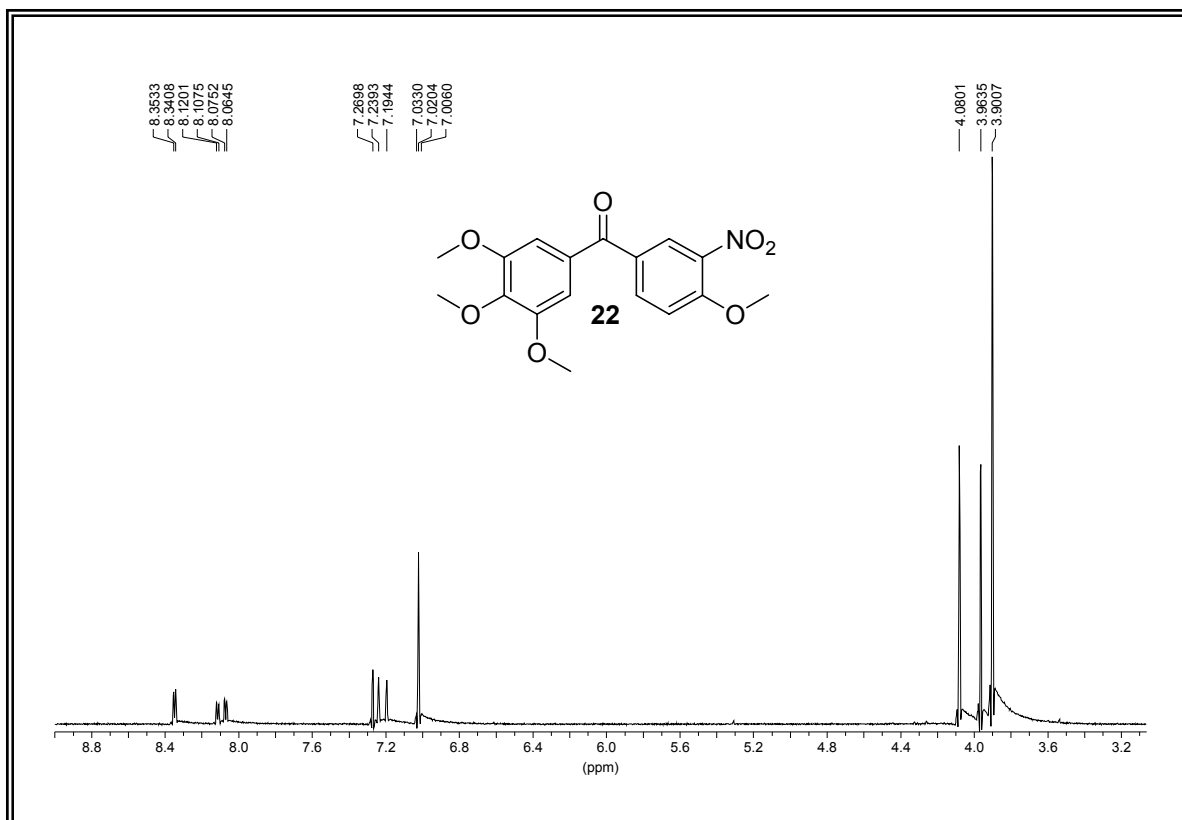
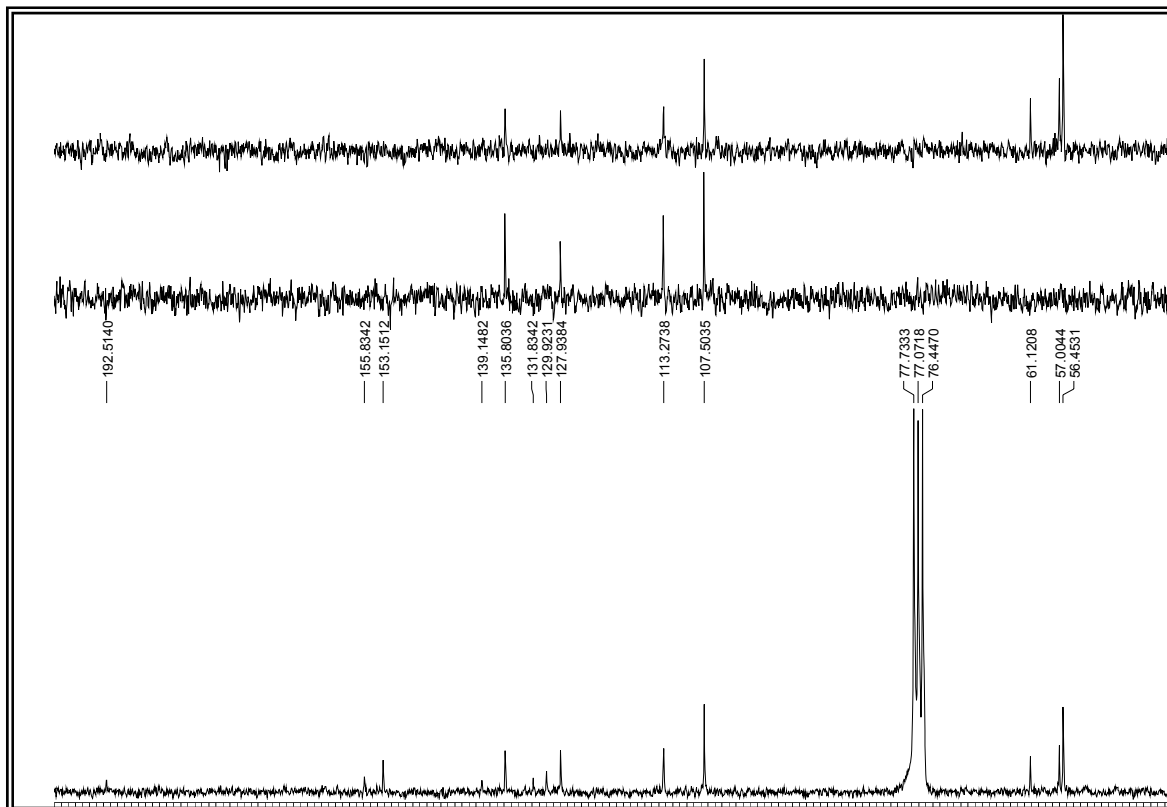


Figura IV. Espectro de RMN ¹H del compuesto **21**.

Figura Va. Espectro de RMN ^1H del compuesto **22**.Figura Vb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **22**.

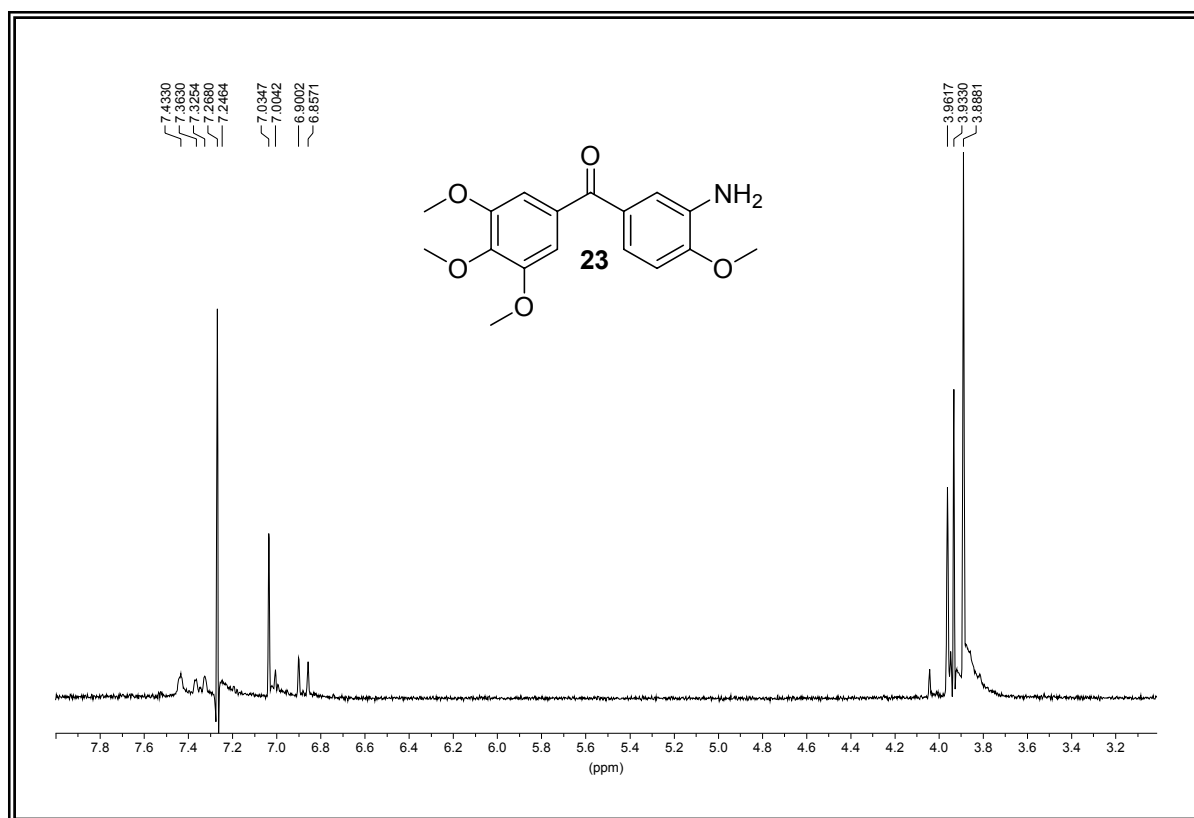


Figura VIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **23**.

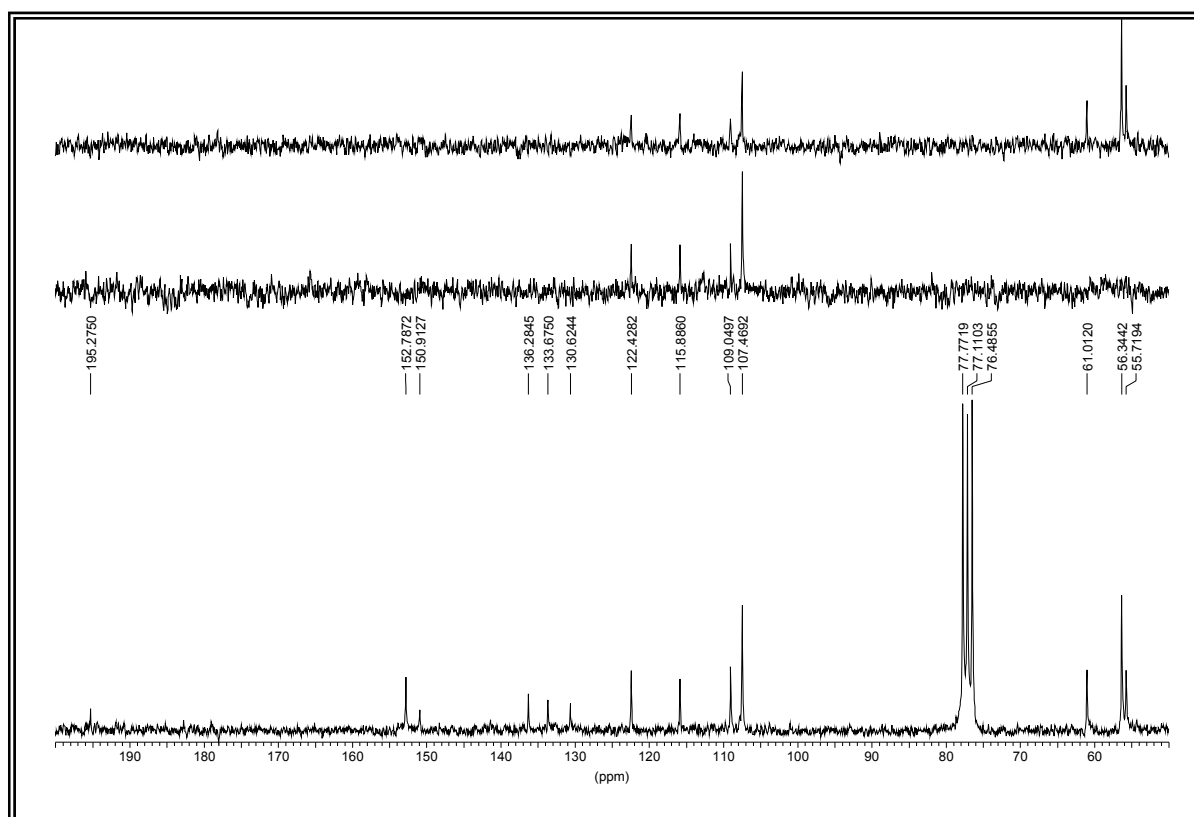


Figura VIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **23**.

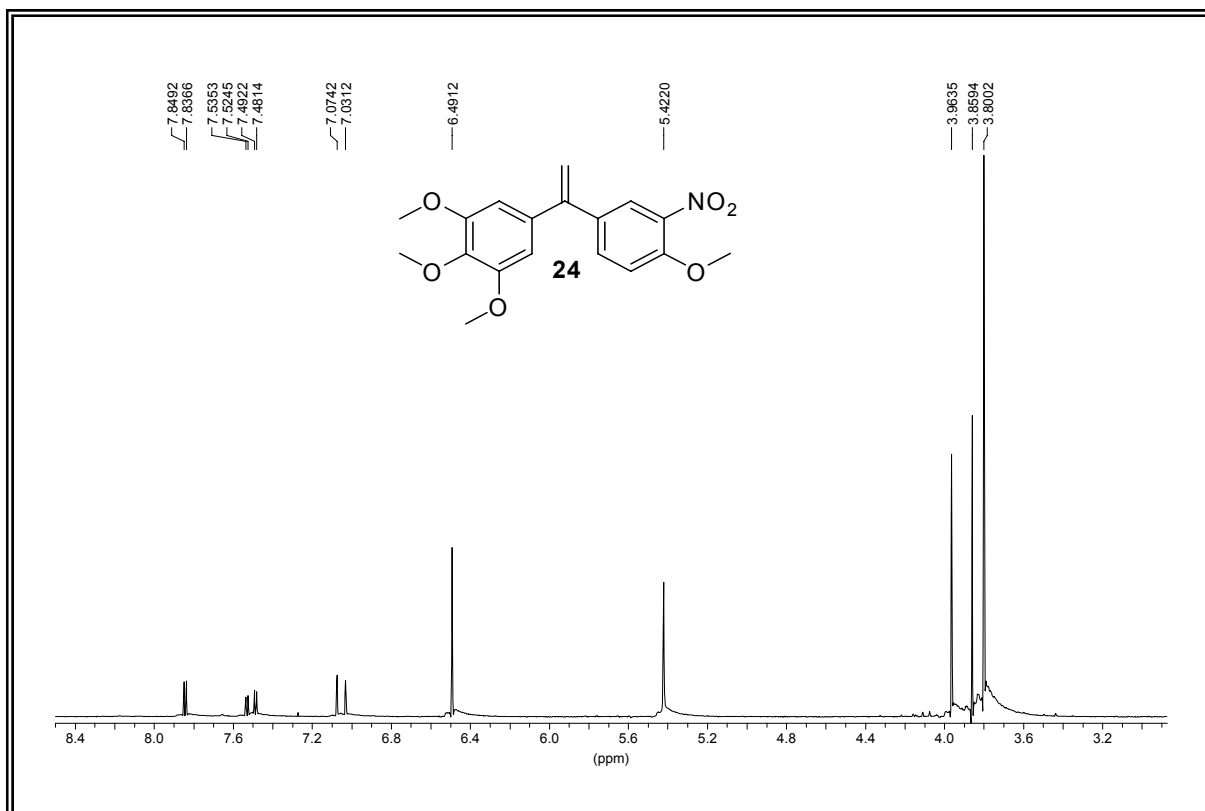


Figura VIIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **24**.

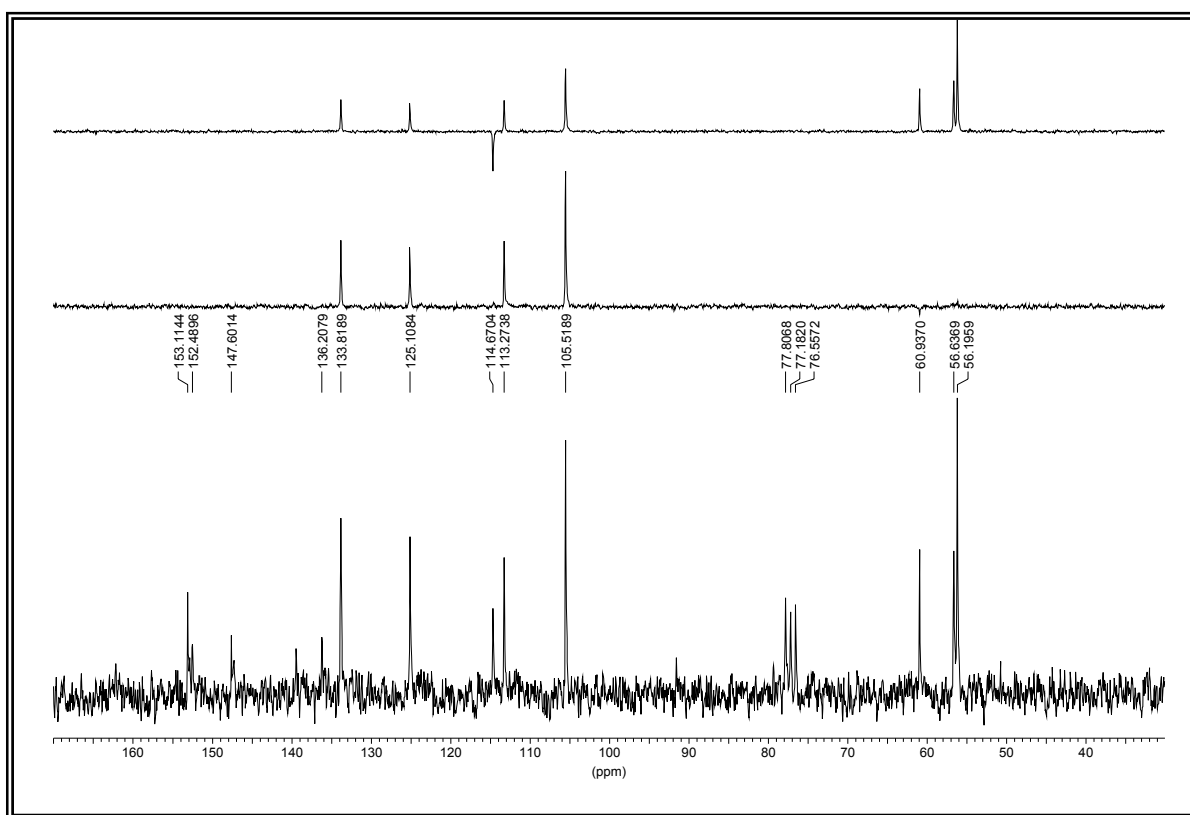


Figura VIIb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **24**.

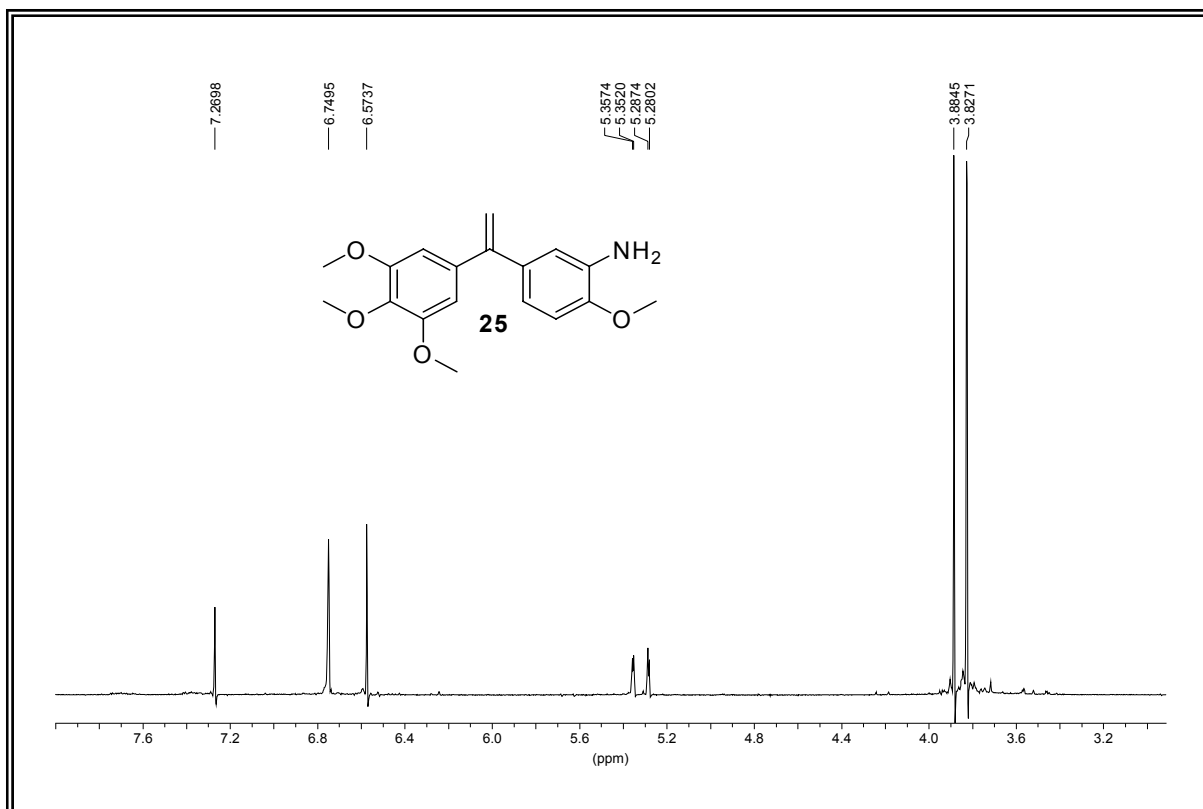


Figura VIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **25**.

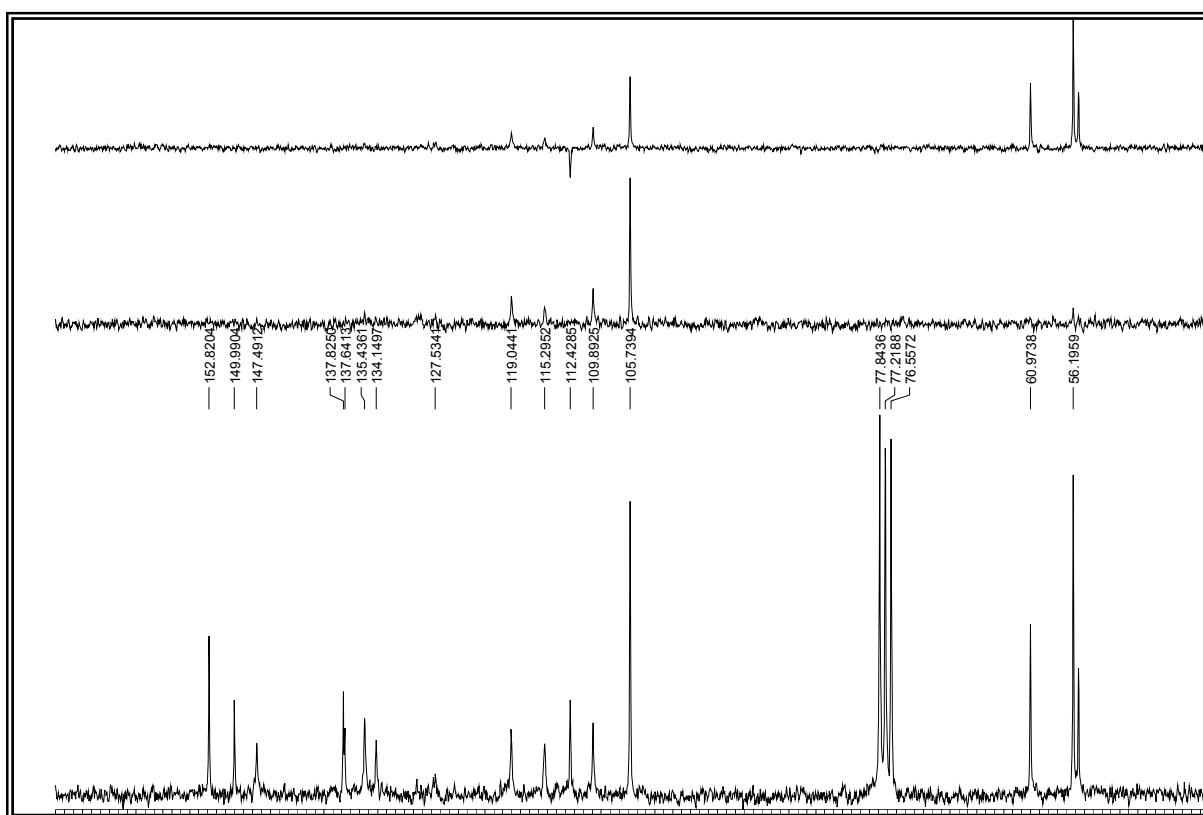


Figura VIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **25**.

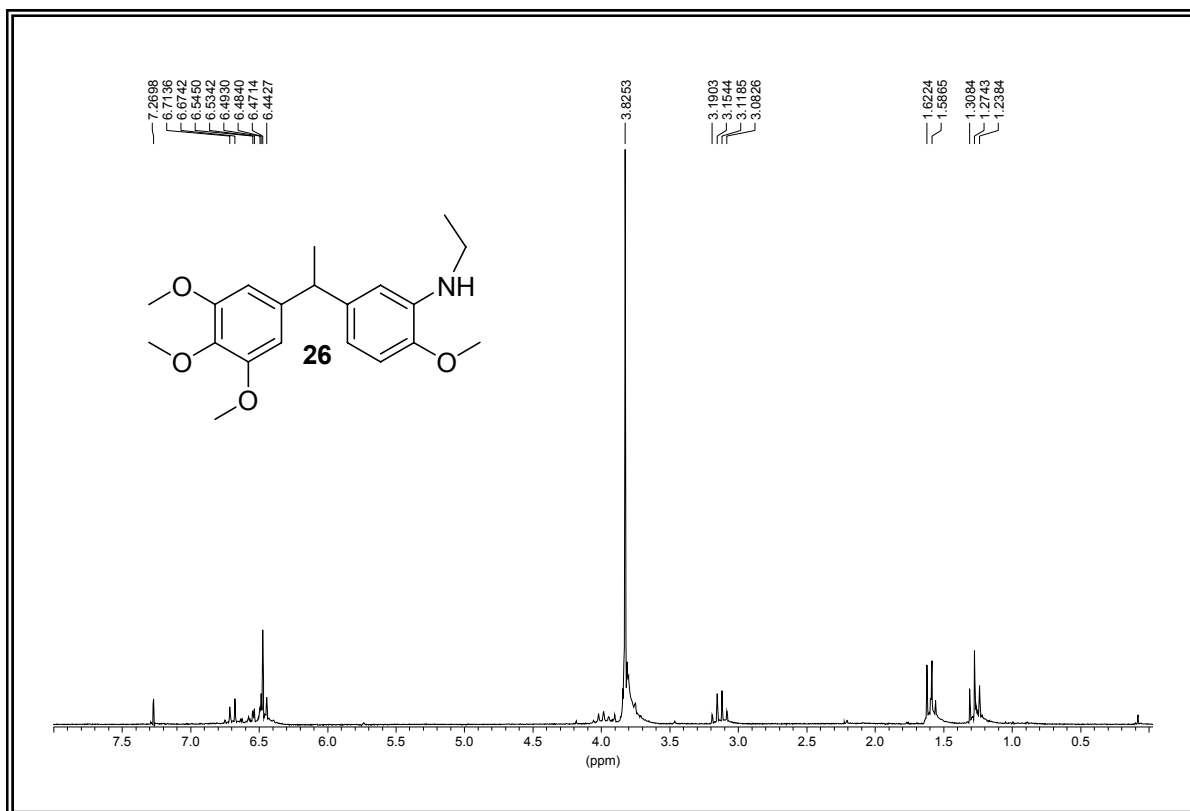


Figura IXa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **26**.

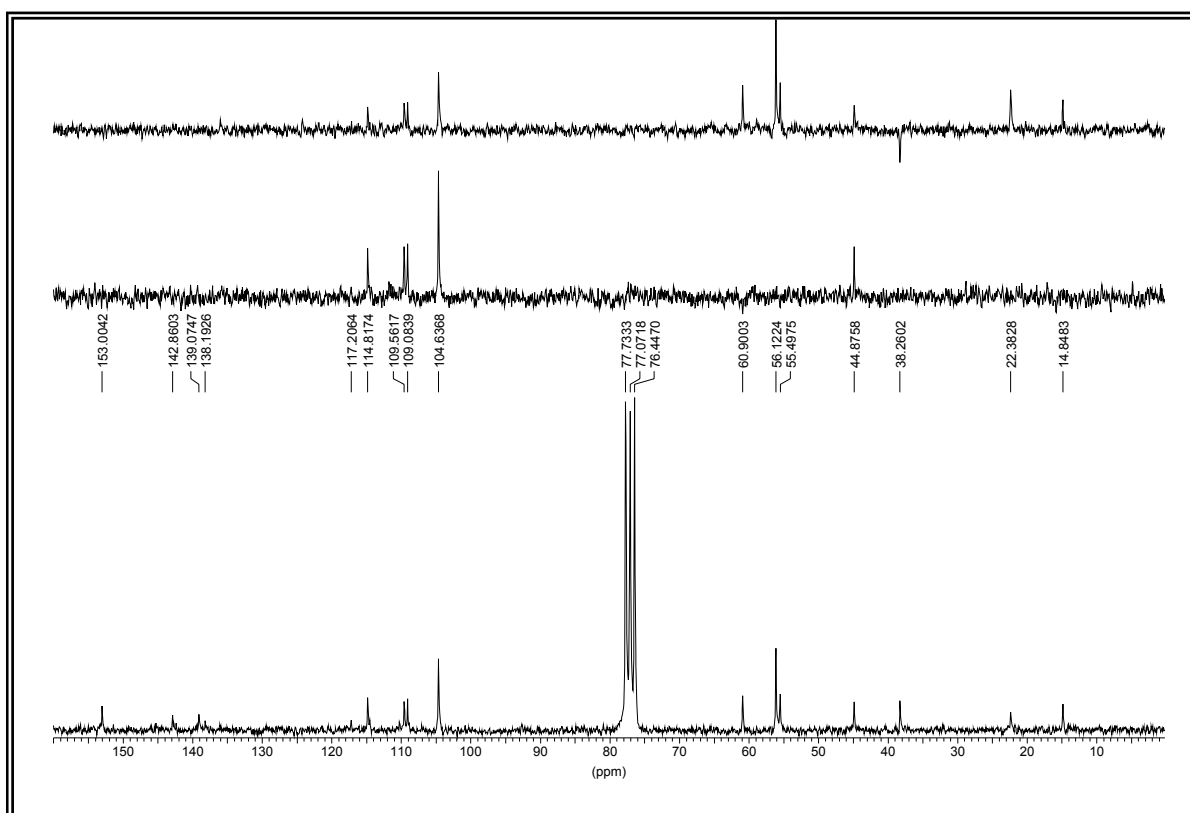


Figura IXb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **26**.

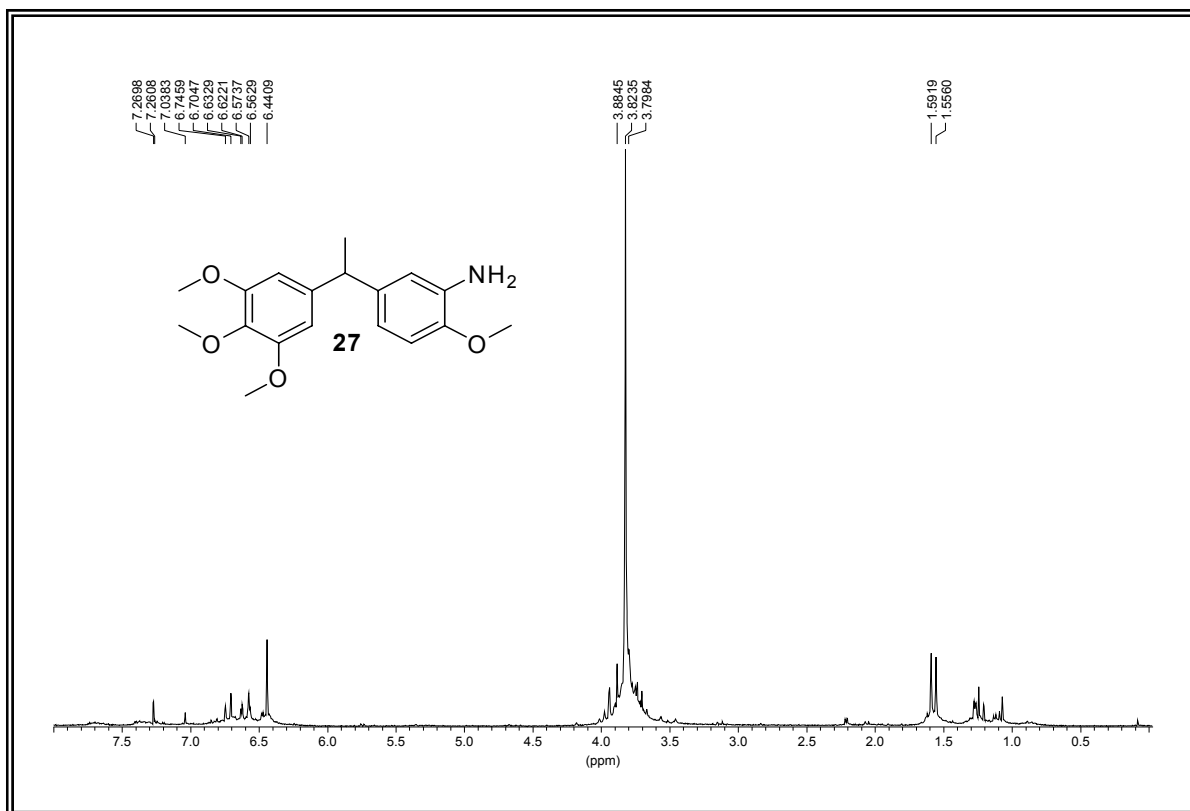


Figura Xa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **27**.

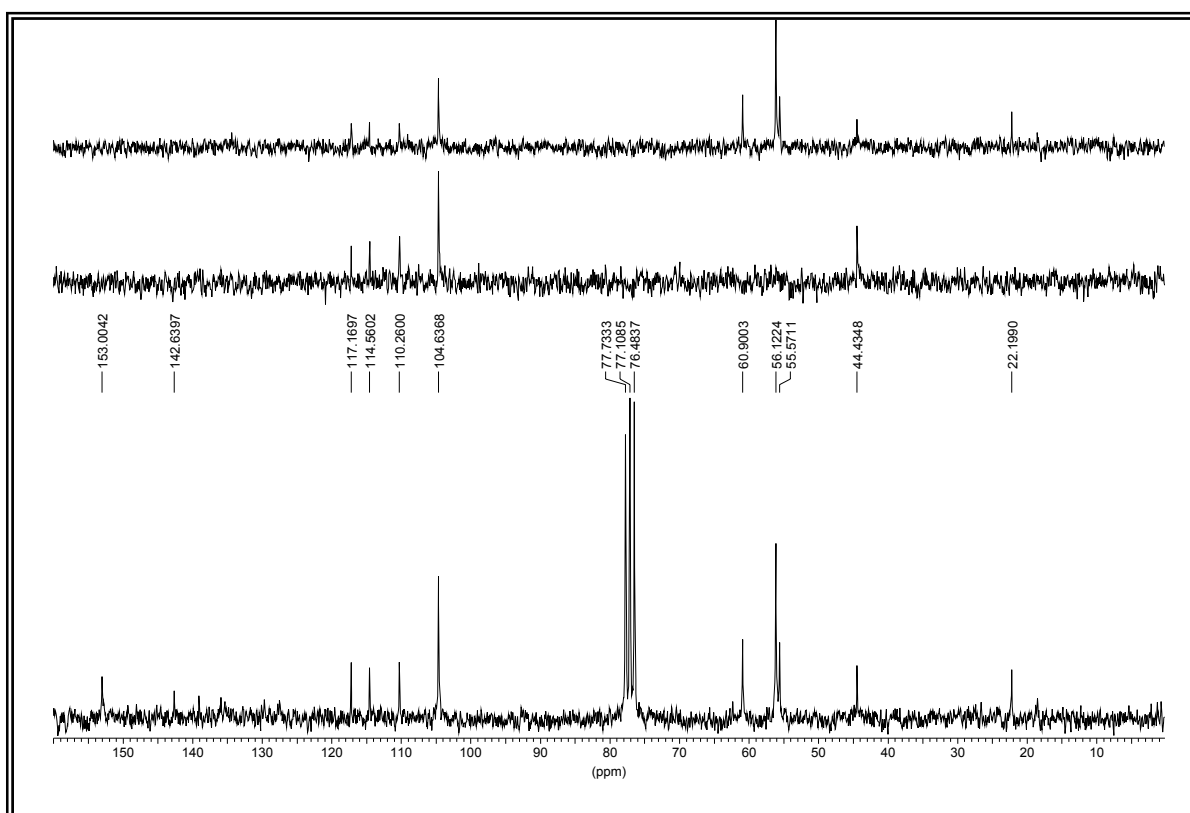


Figura Xb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **27**.

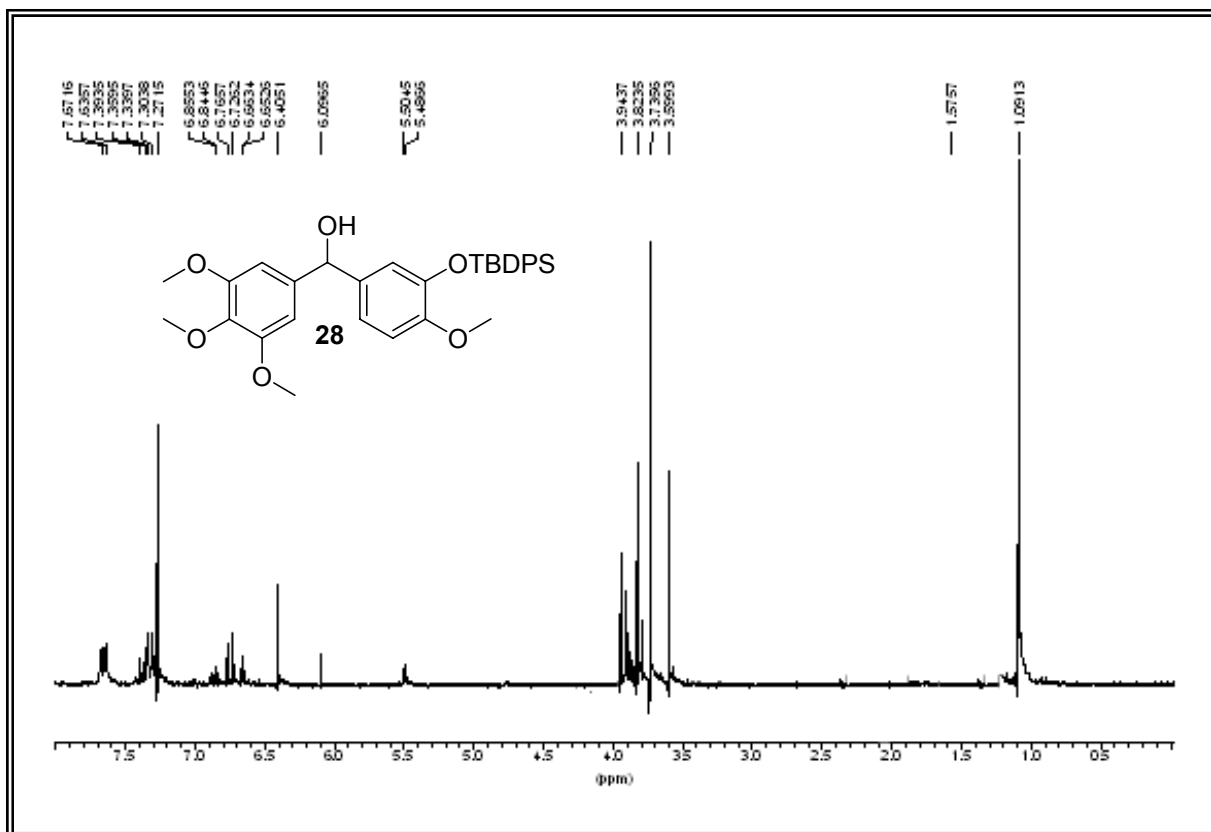


Figura XIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **28**.

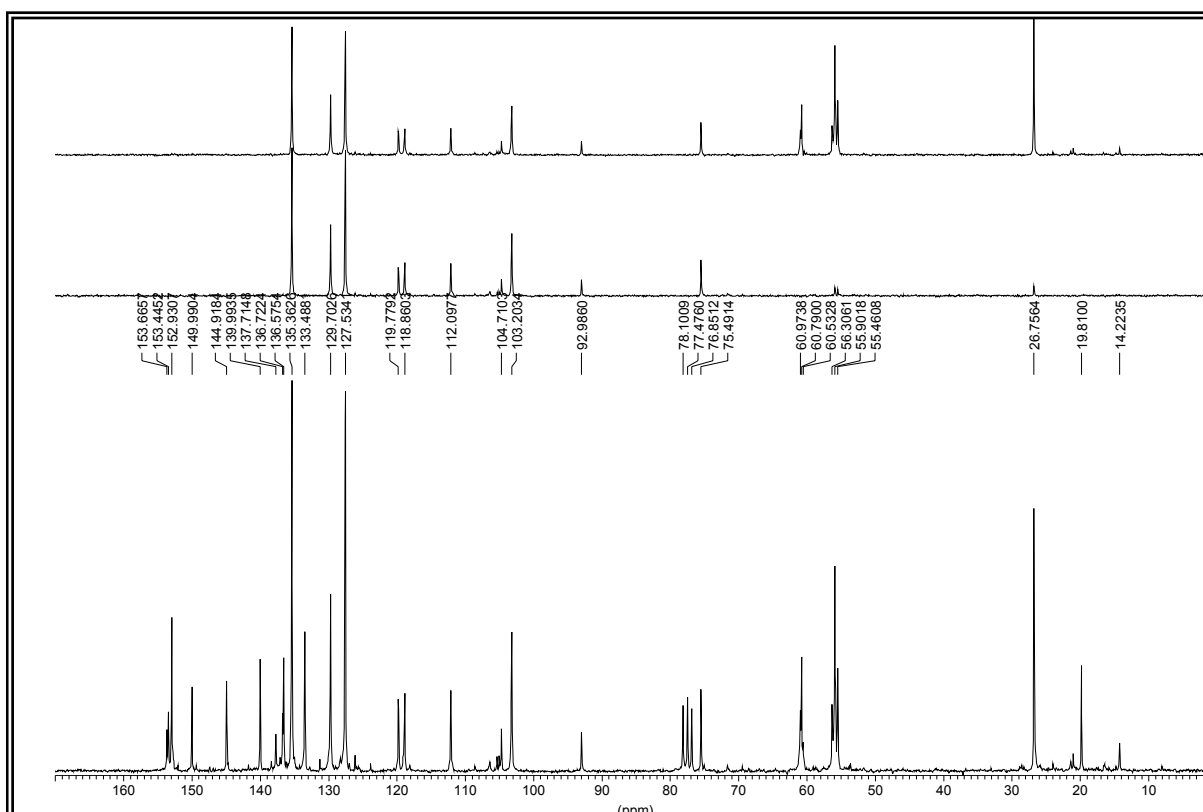


Figura XIb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **28**.

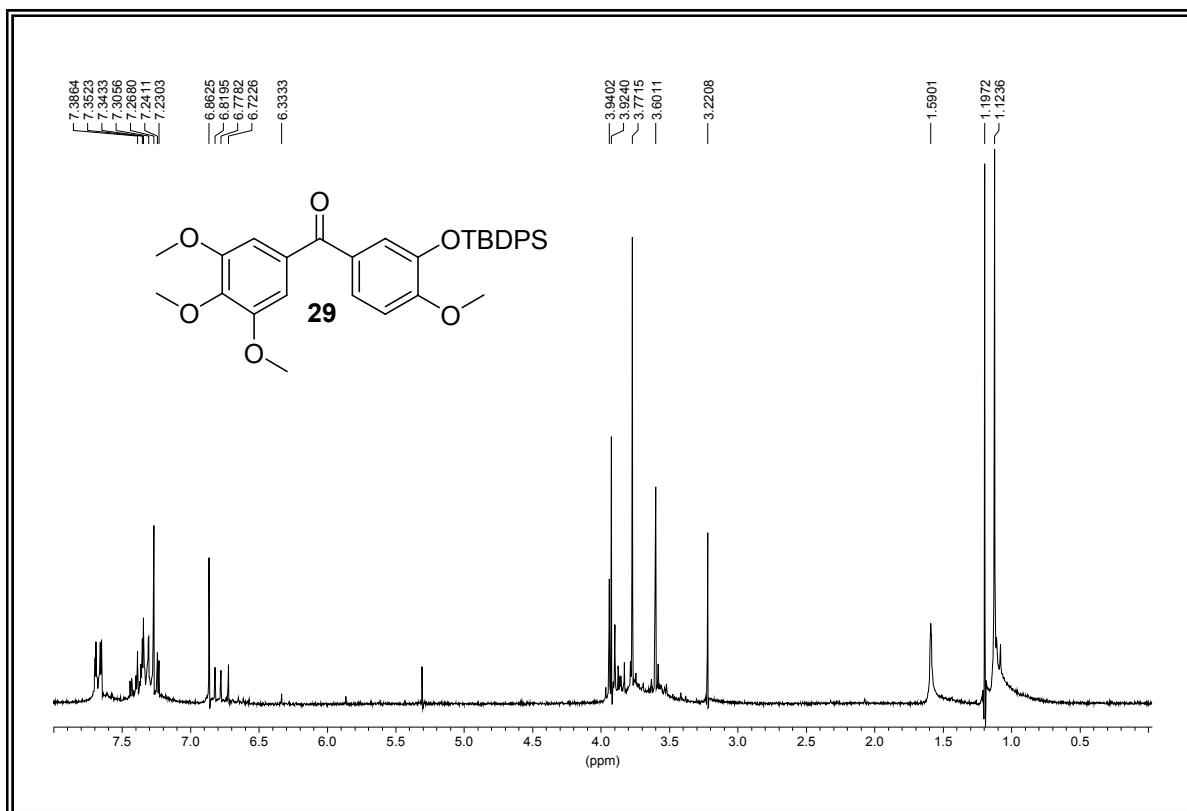


Figura XIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **29**.

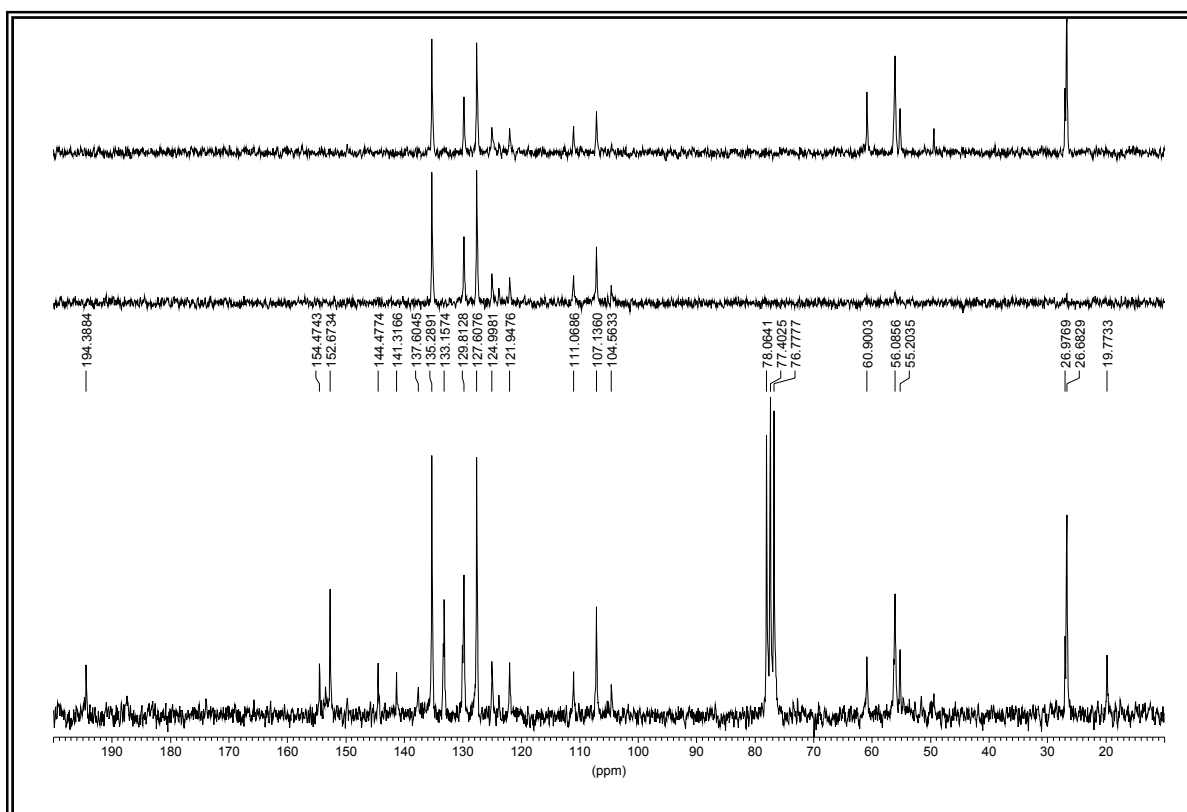


Figura XIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **29**.

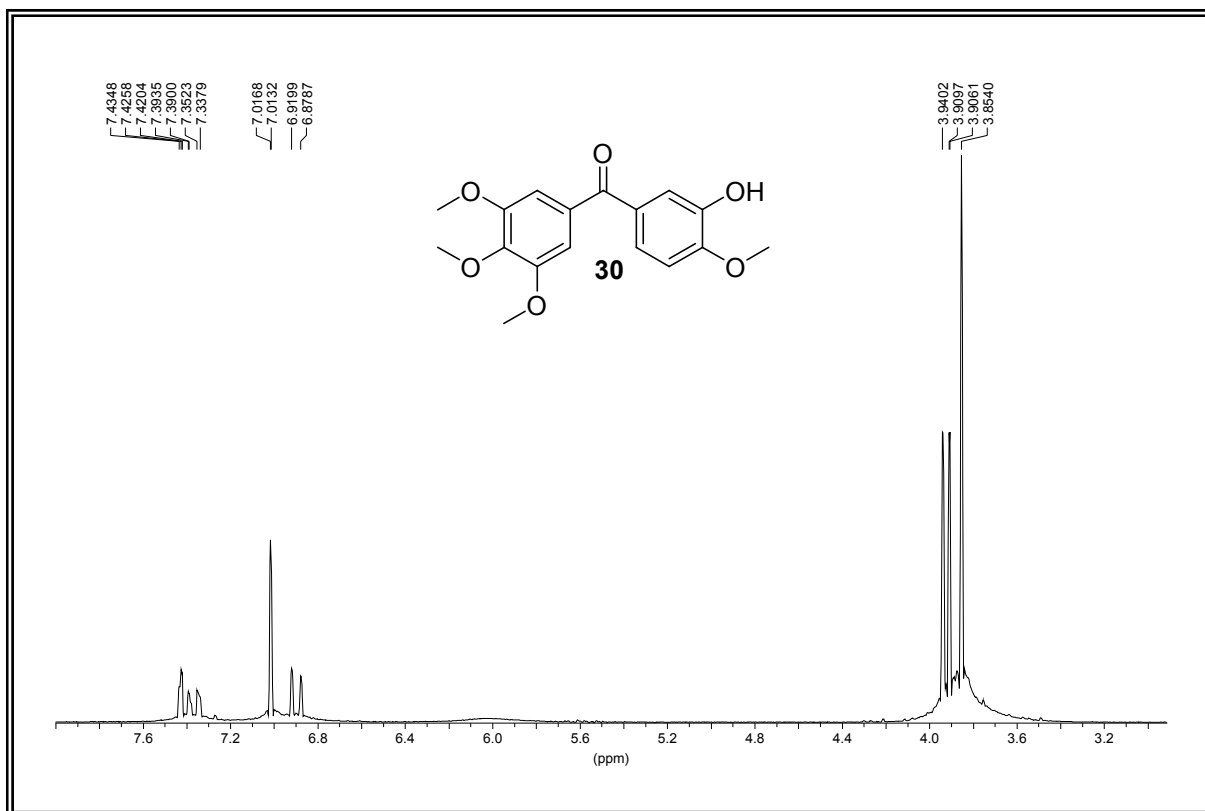


Figura XIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **30**.

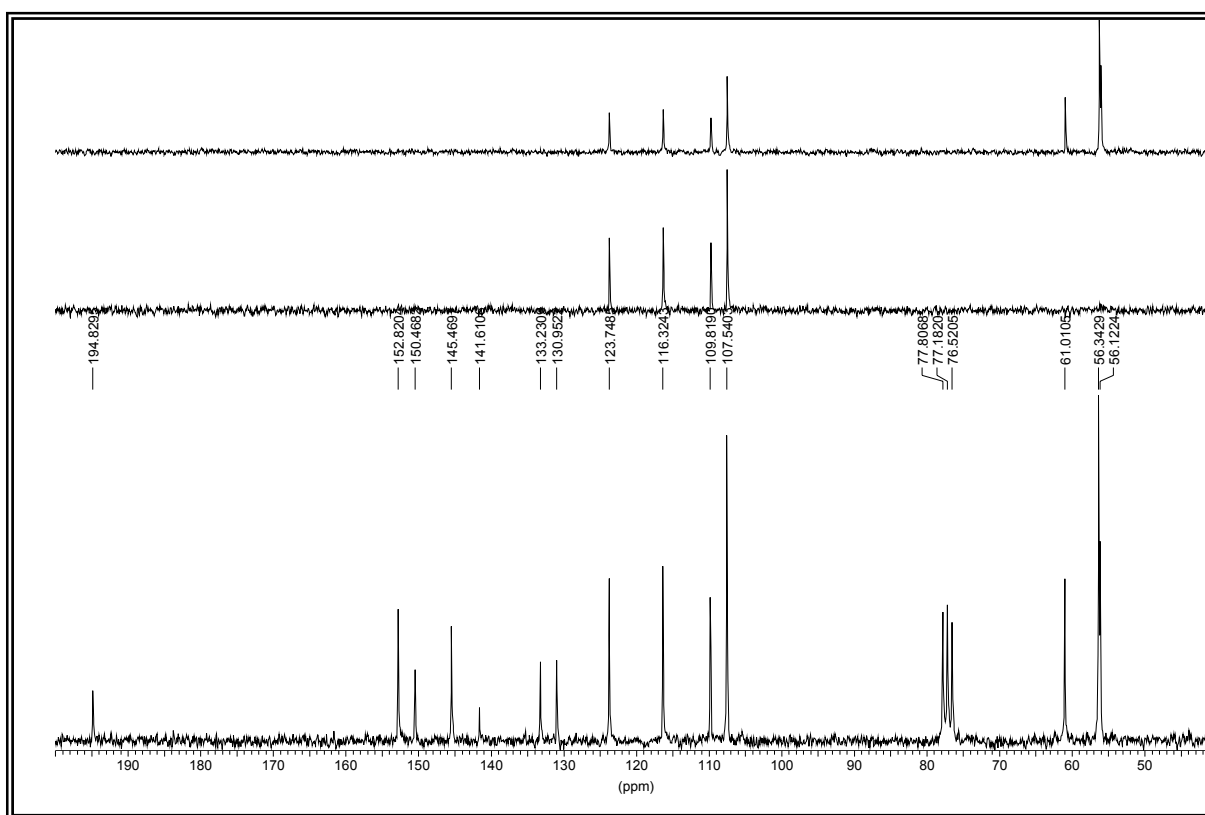


Figura XIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **30**.

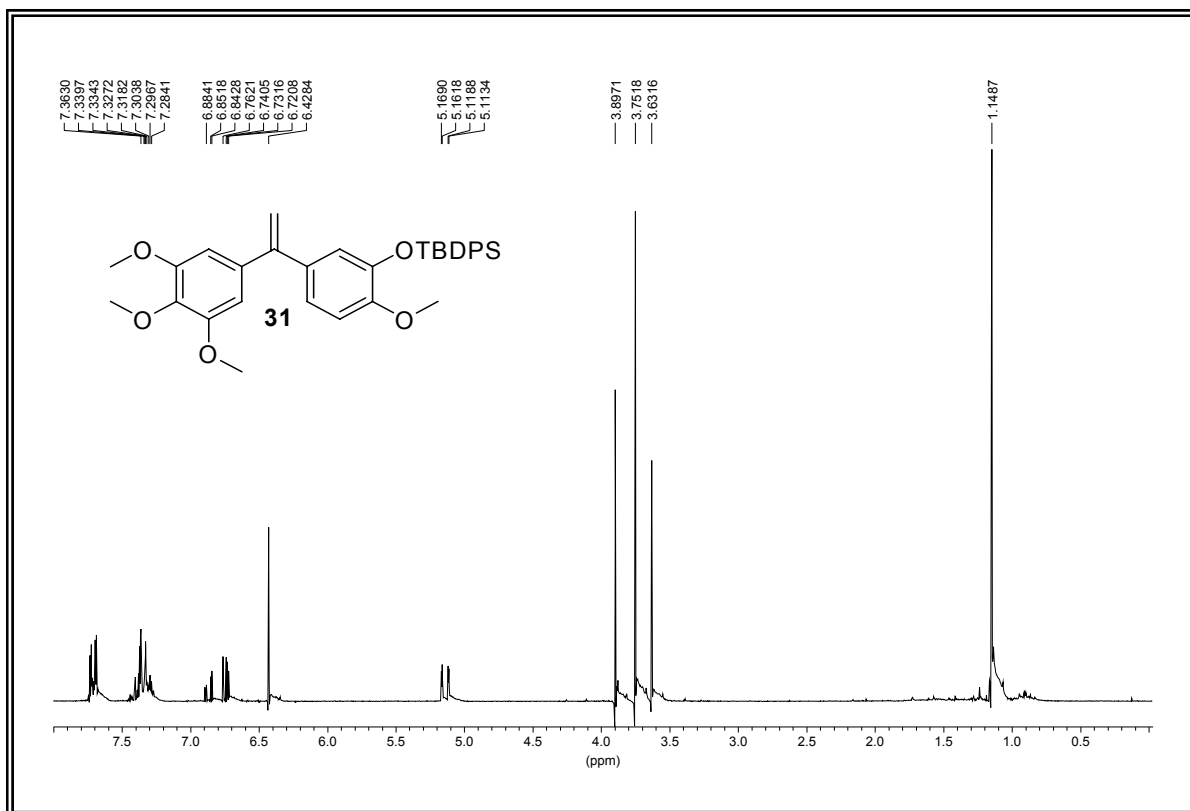


Figura XIVa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **31**.

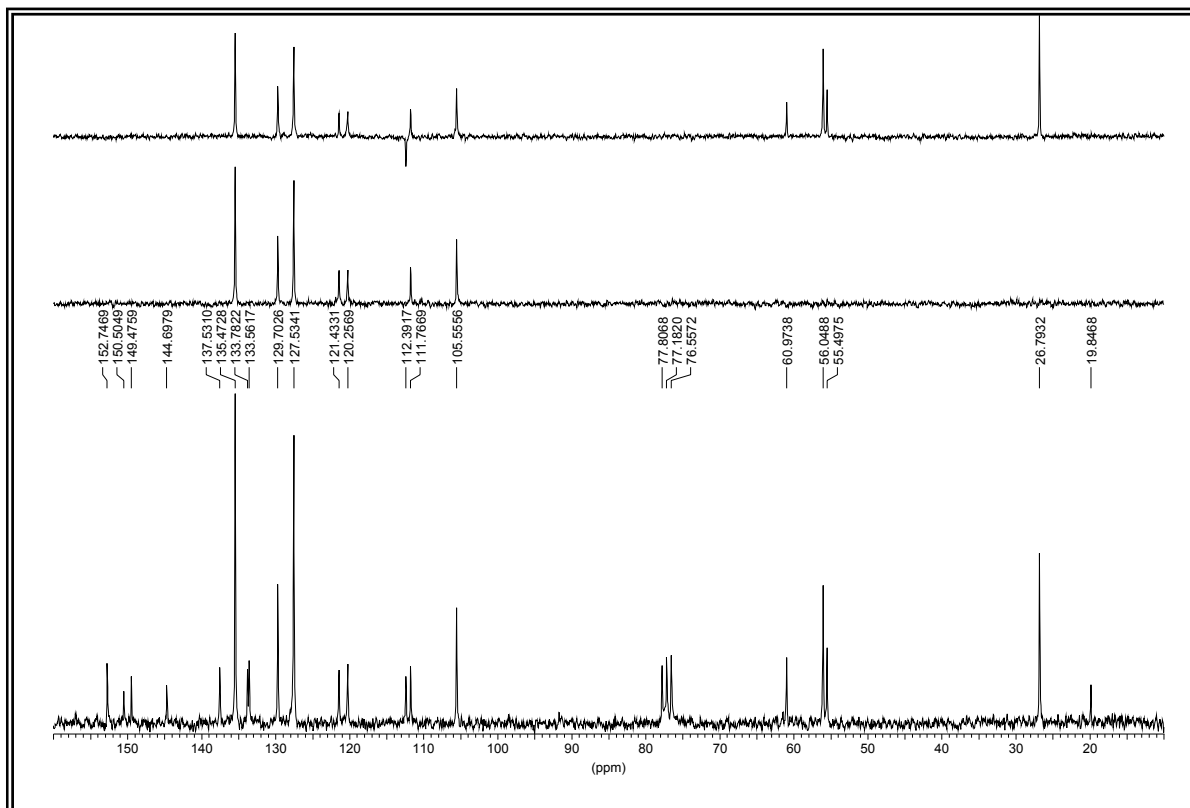
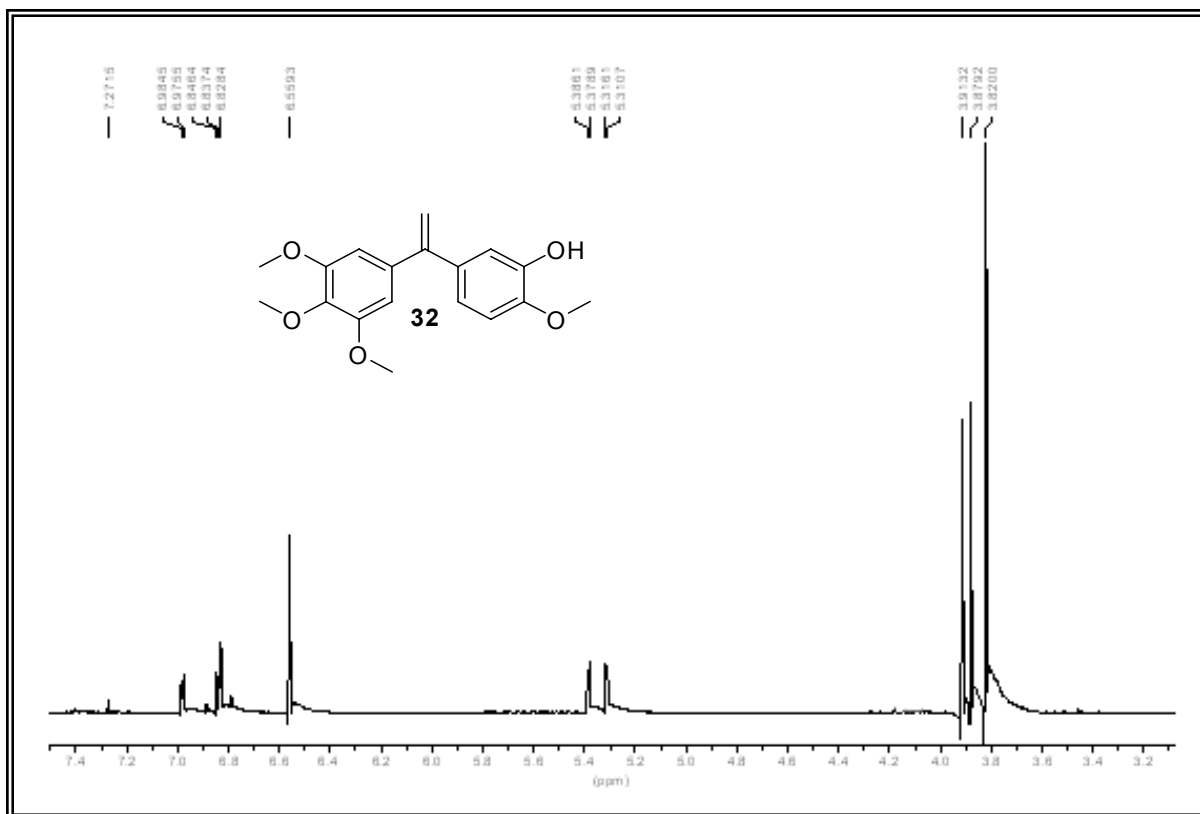
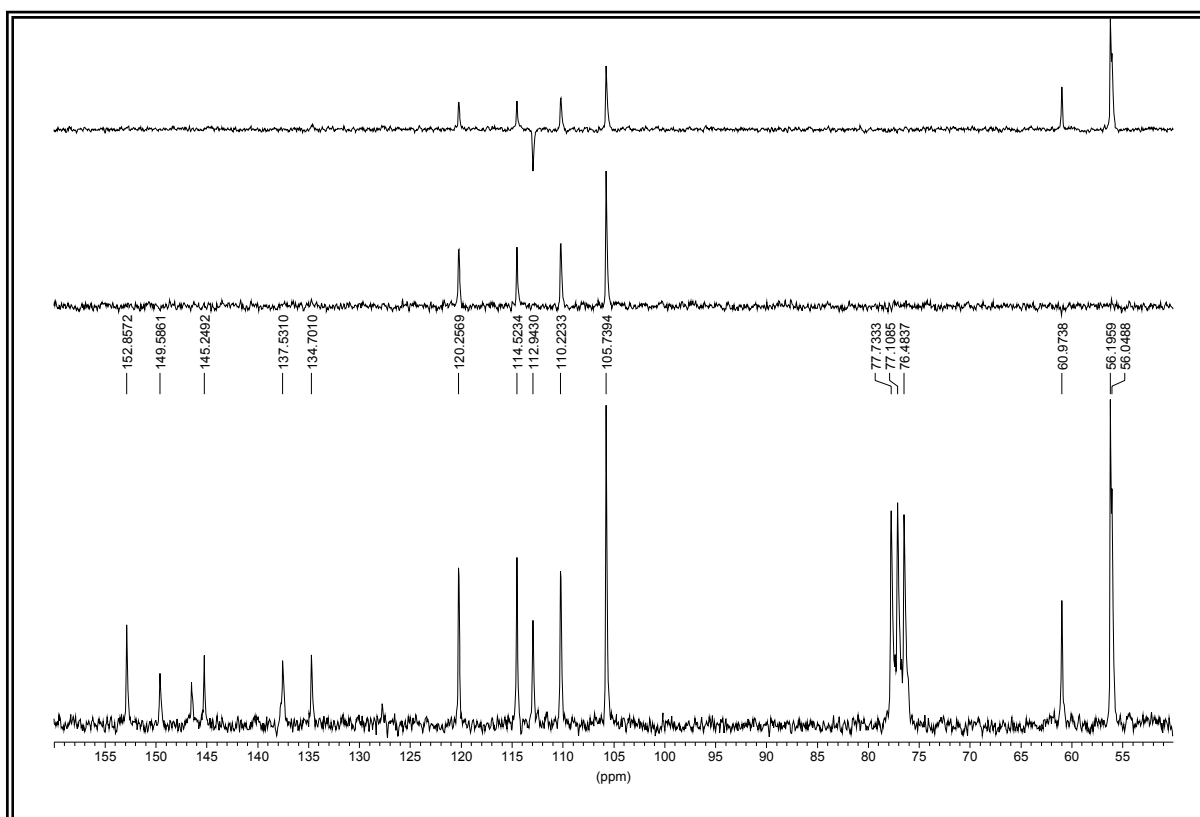


Figura XIVb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **31**.

Figura XVa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **32**.Figura XVb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **32**.

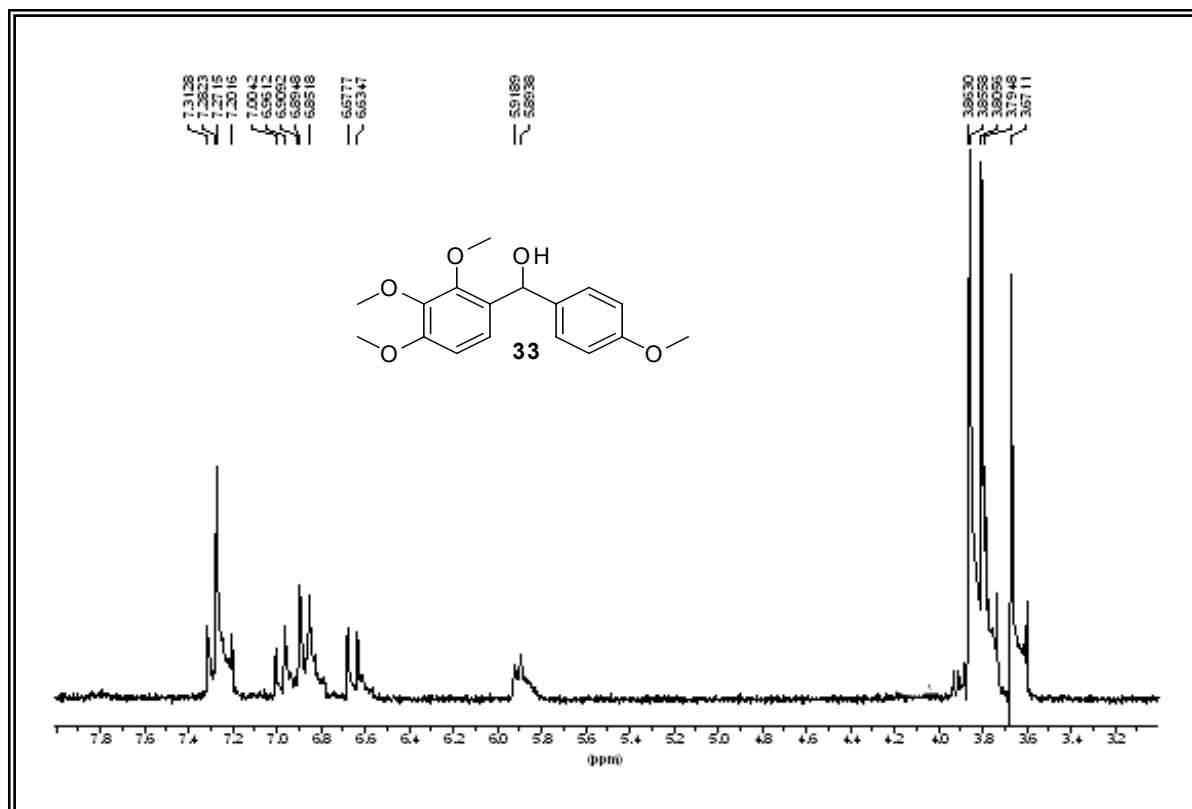


Figura XVIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **33**.

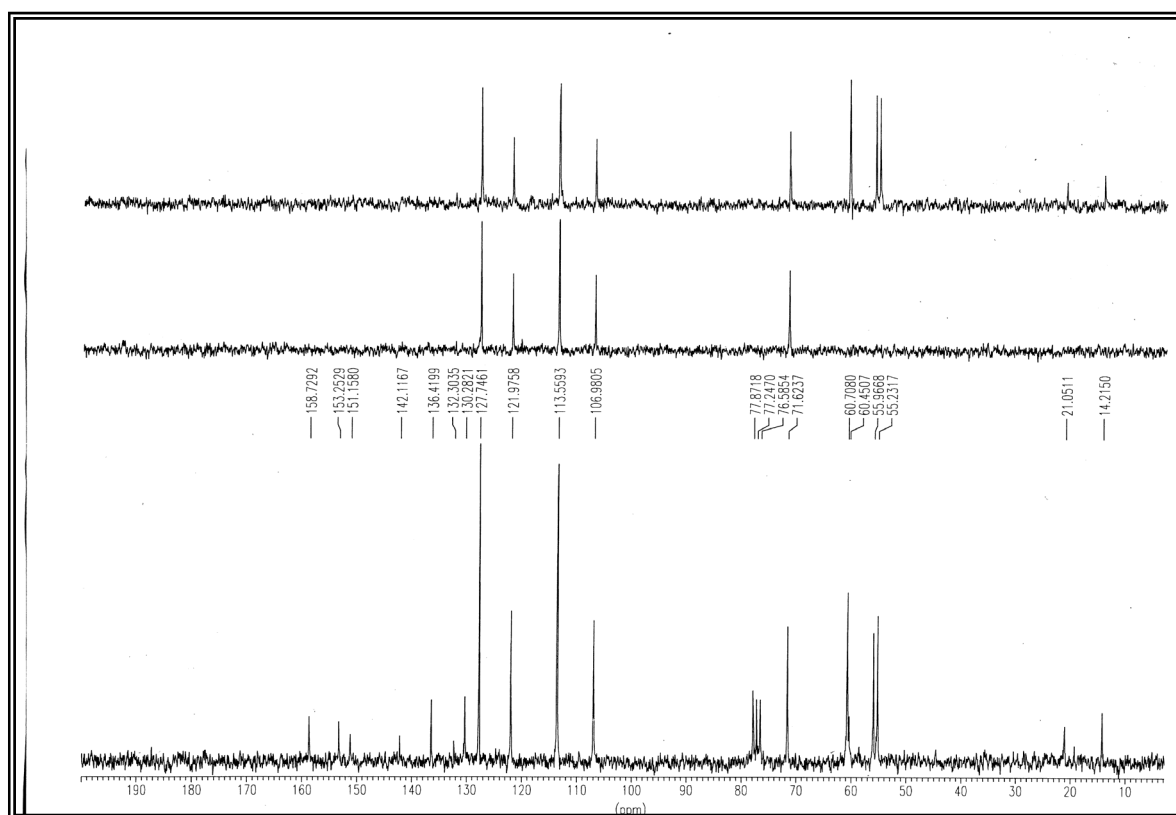


Figura XVIa. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **33**.

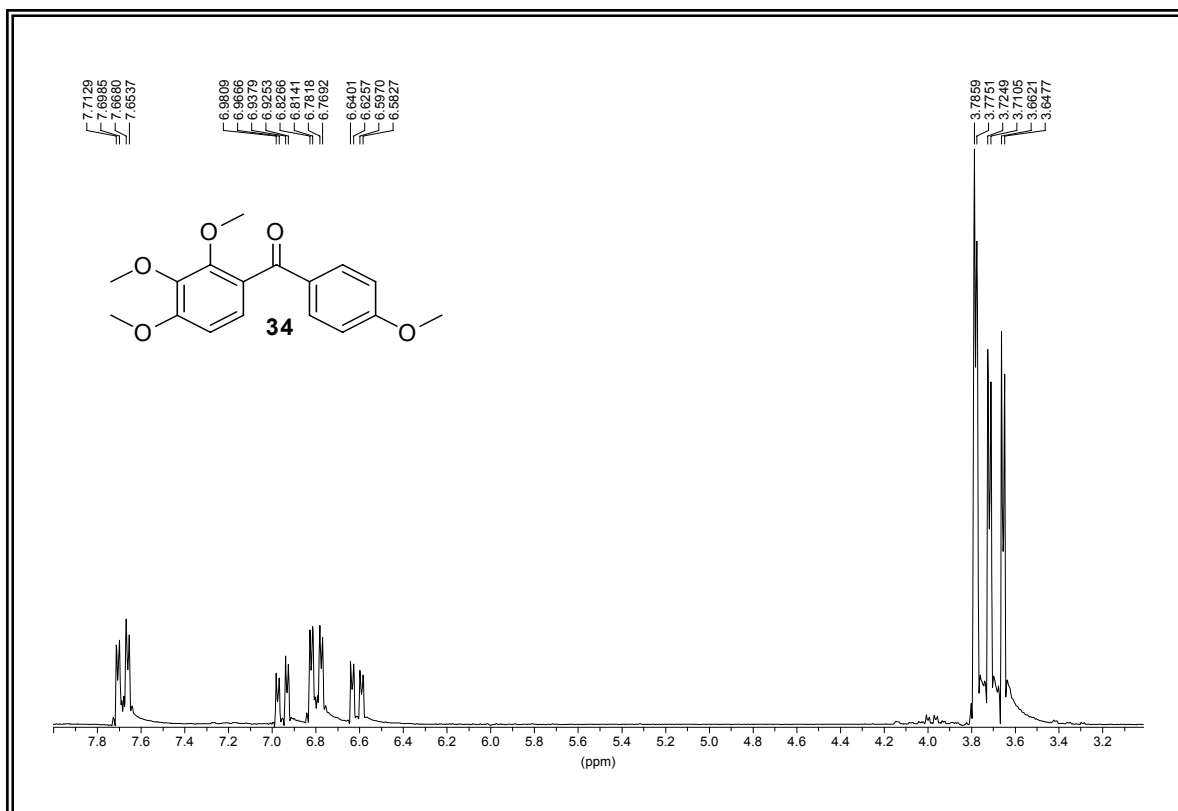


Figura XVIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **34**.

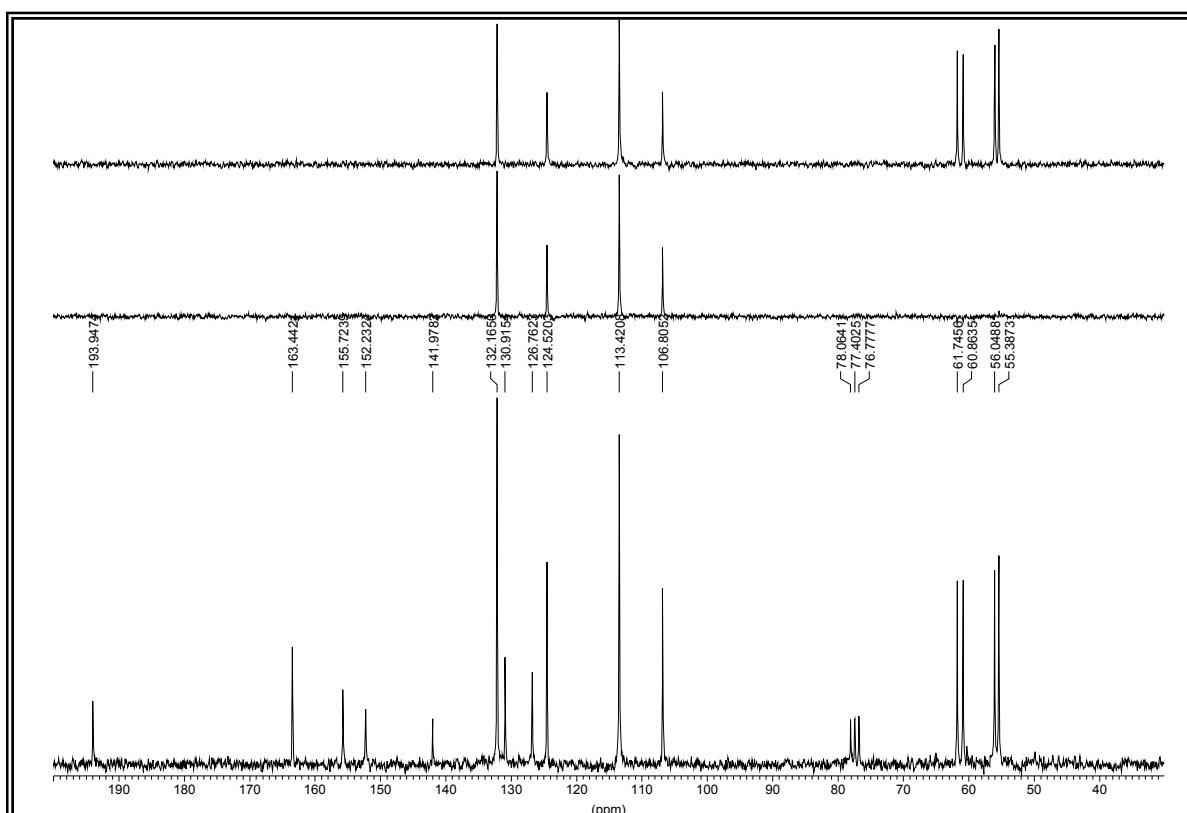


Figura XVIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **34**.

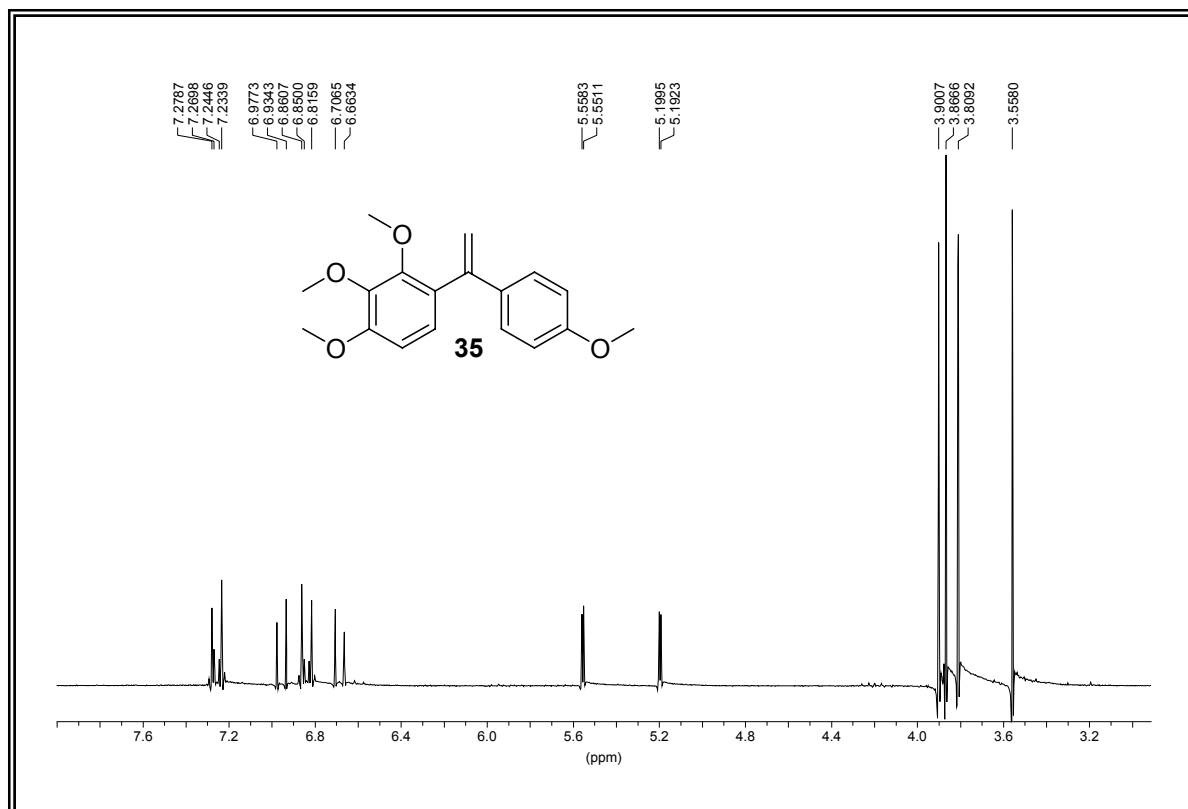


Figura XVIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **35**.

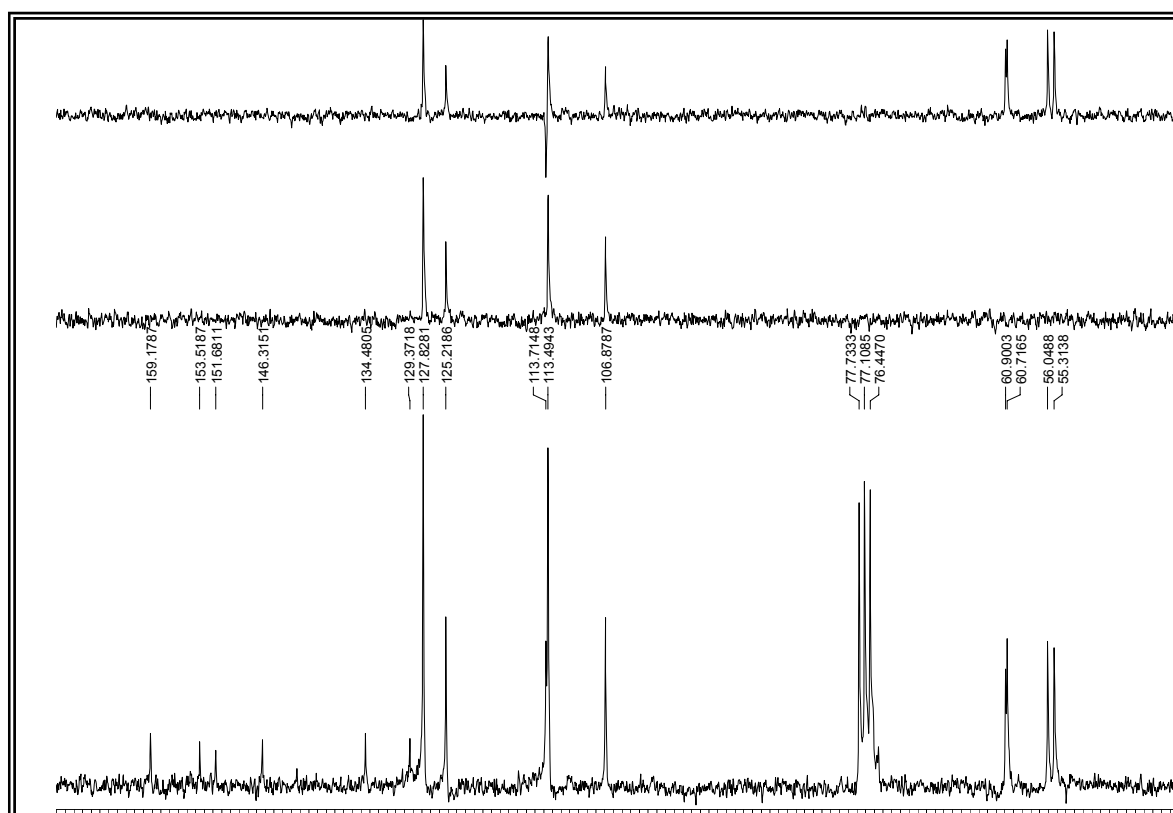


Figura XVIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **35**.

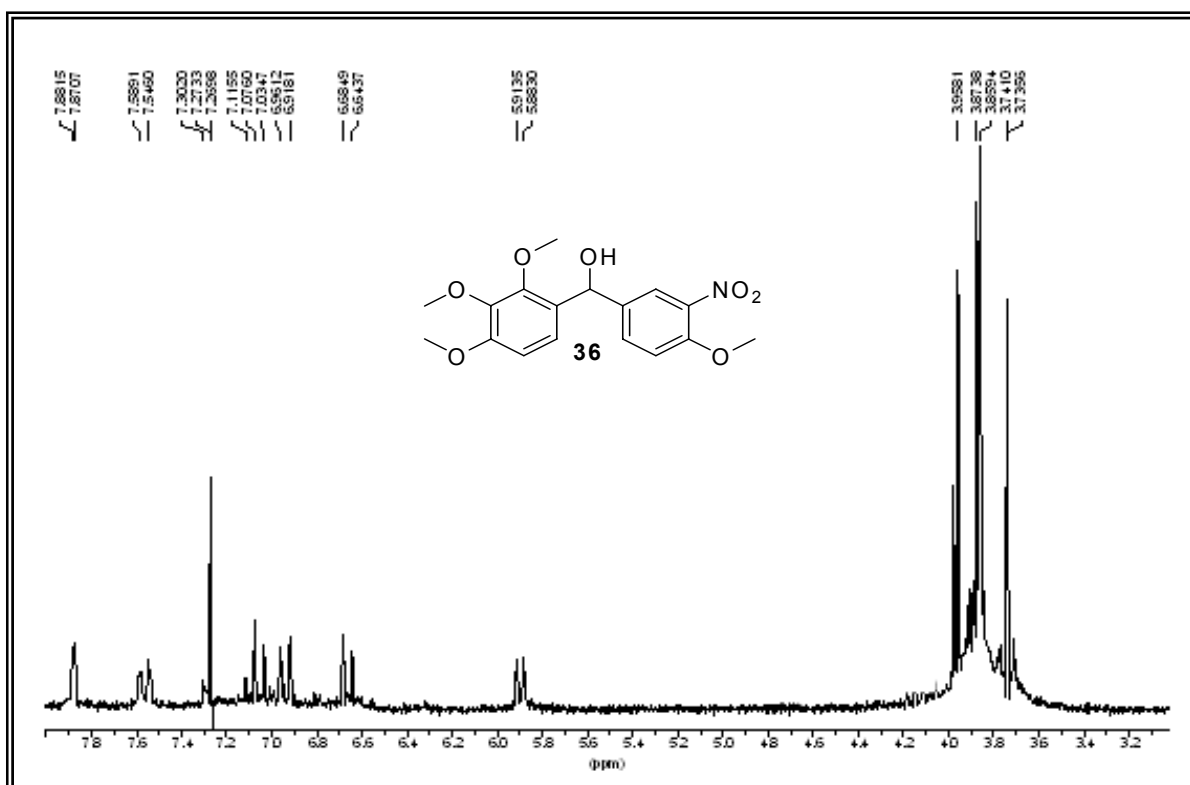


Figura XIXa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **36**.

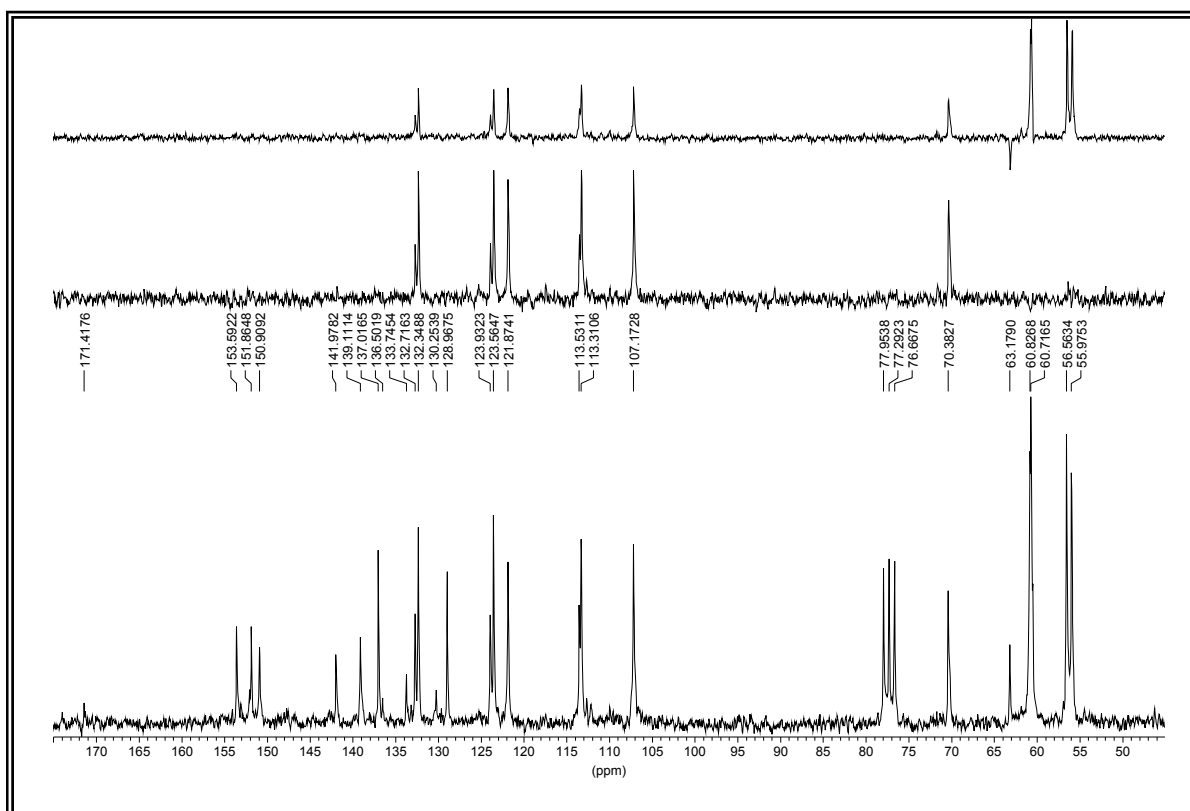


Figura XIXb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **36**.

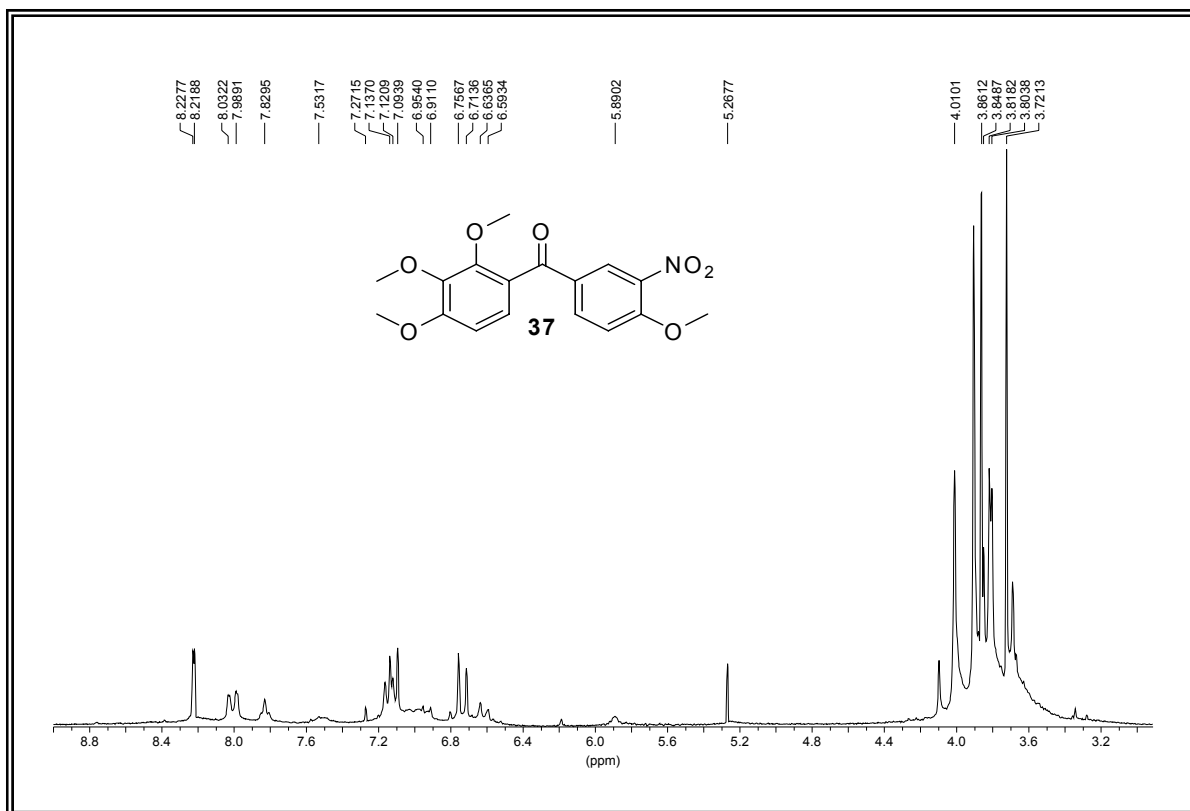


Figura XXa. Espectro de RMN ^1H del compuesto 37.

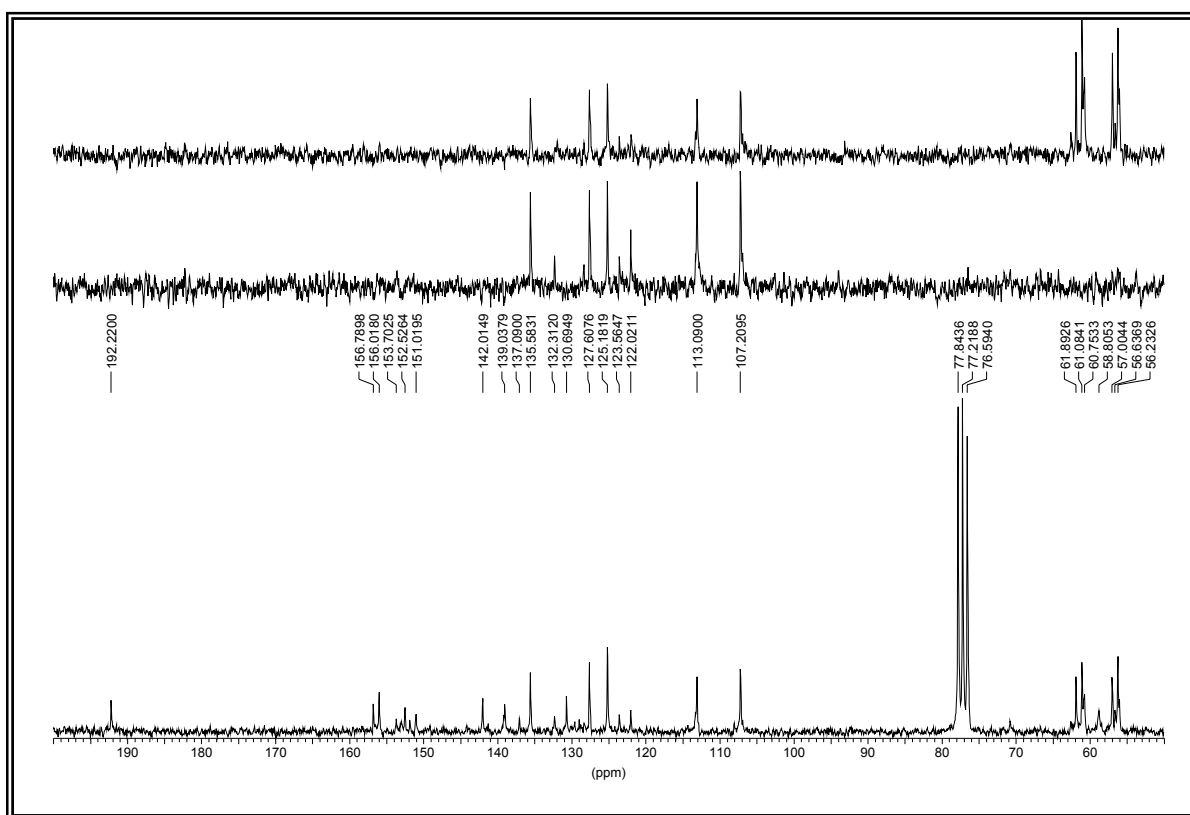


Figura XXb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 37.

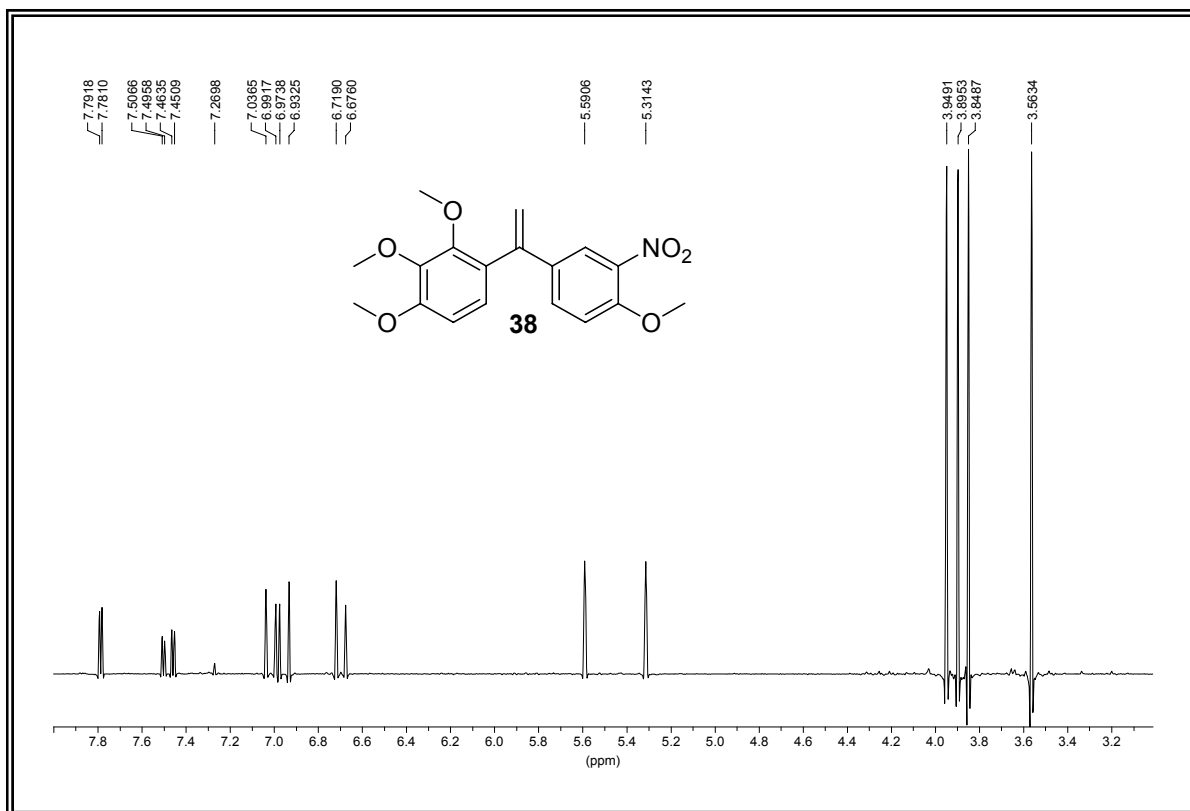


Figura XXIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **38**.

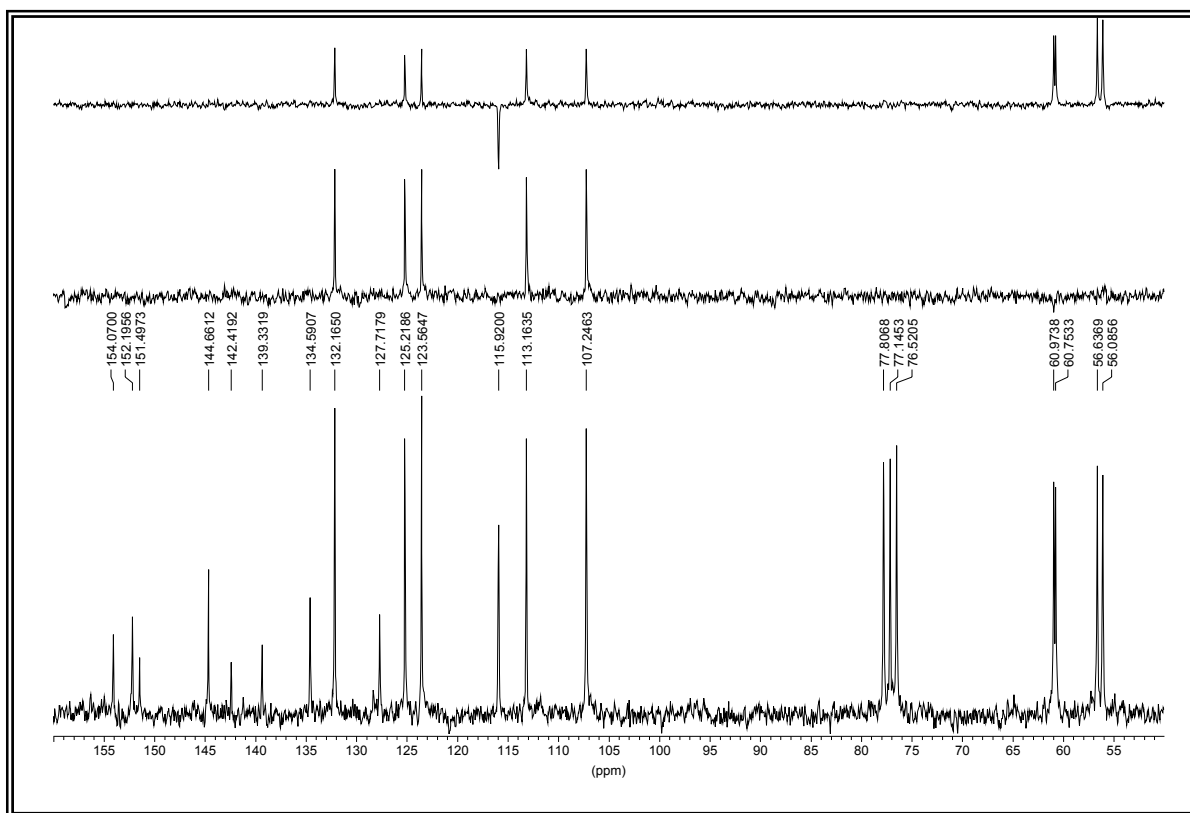


Figura XXIb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **38**.

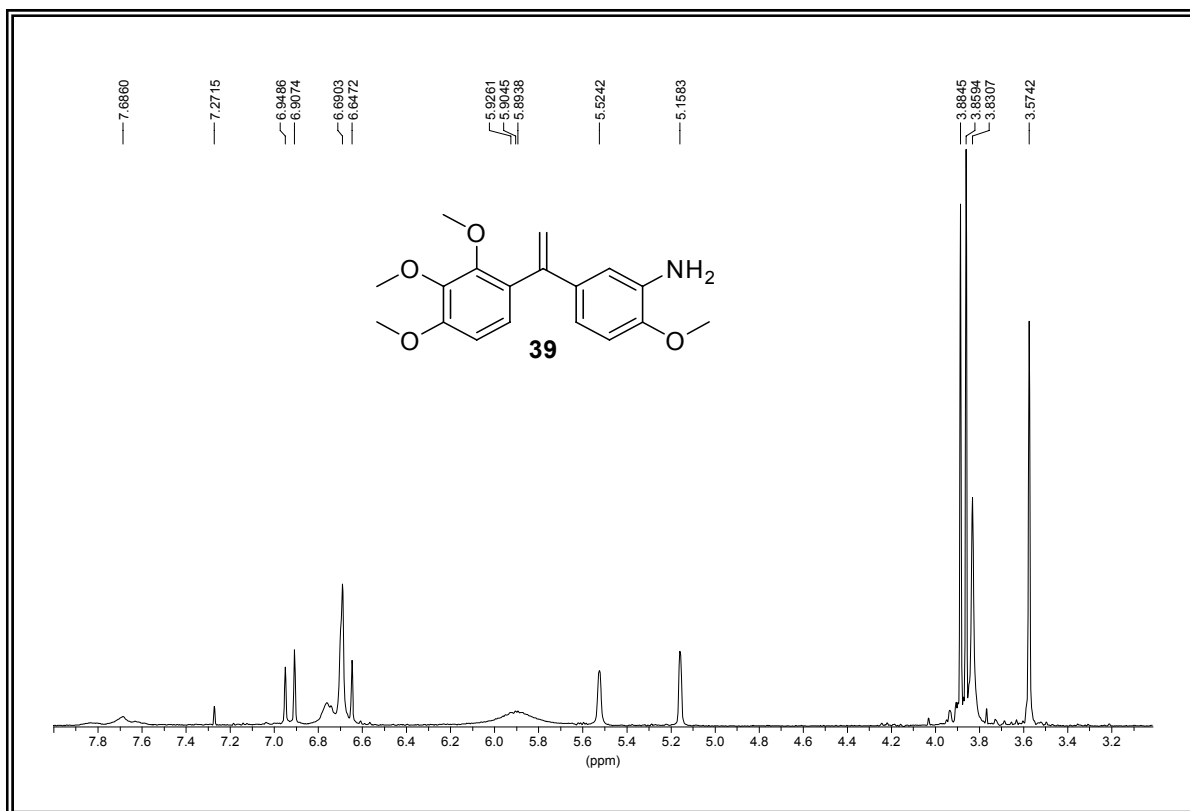


Figura XXIIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **39**.

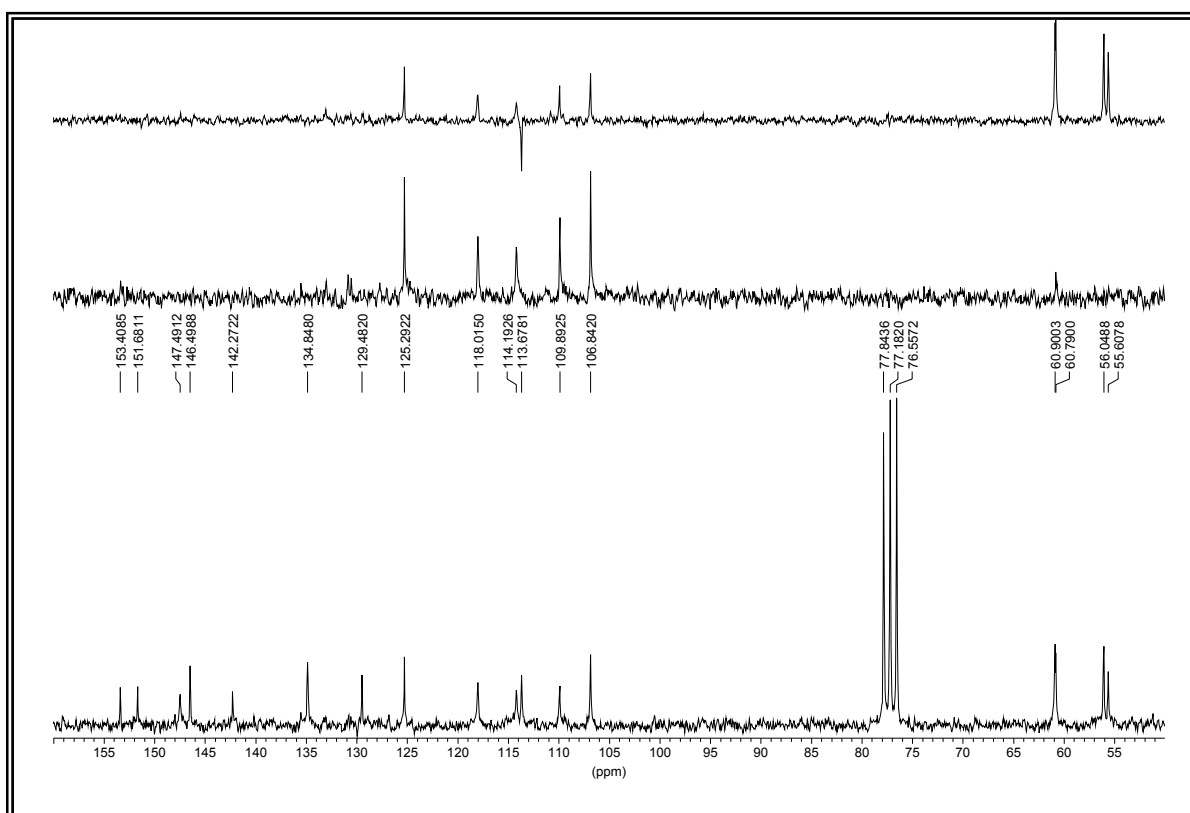


Figura XXIIb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **39**.

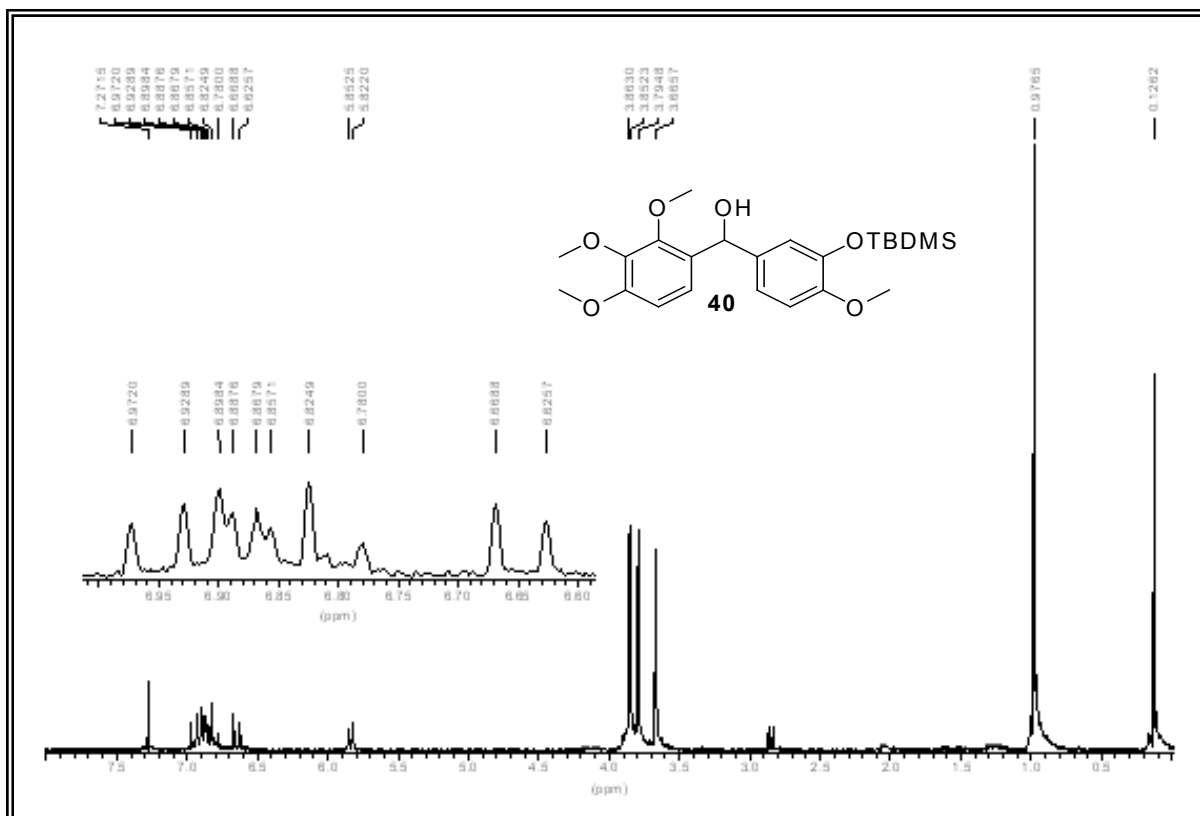


Figura XXIIIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **40**.

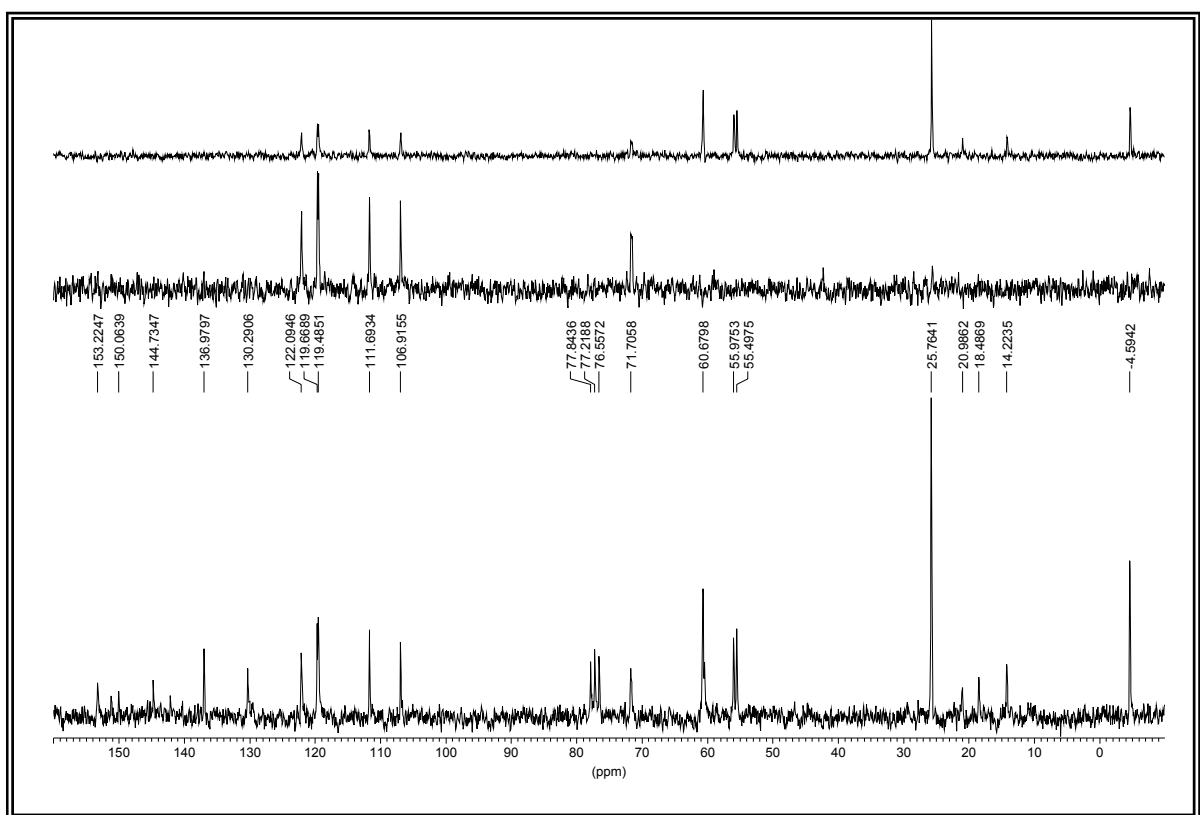


Figura XXIIIb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **40**.

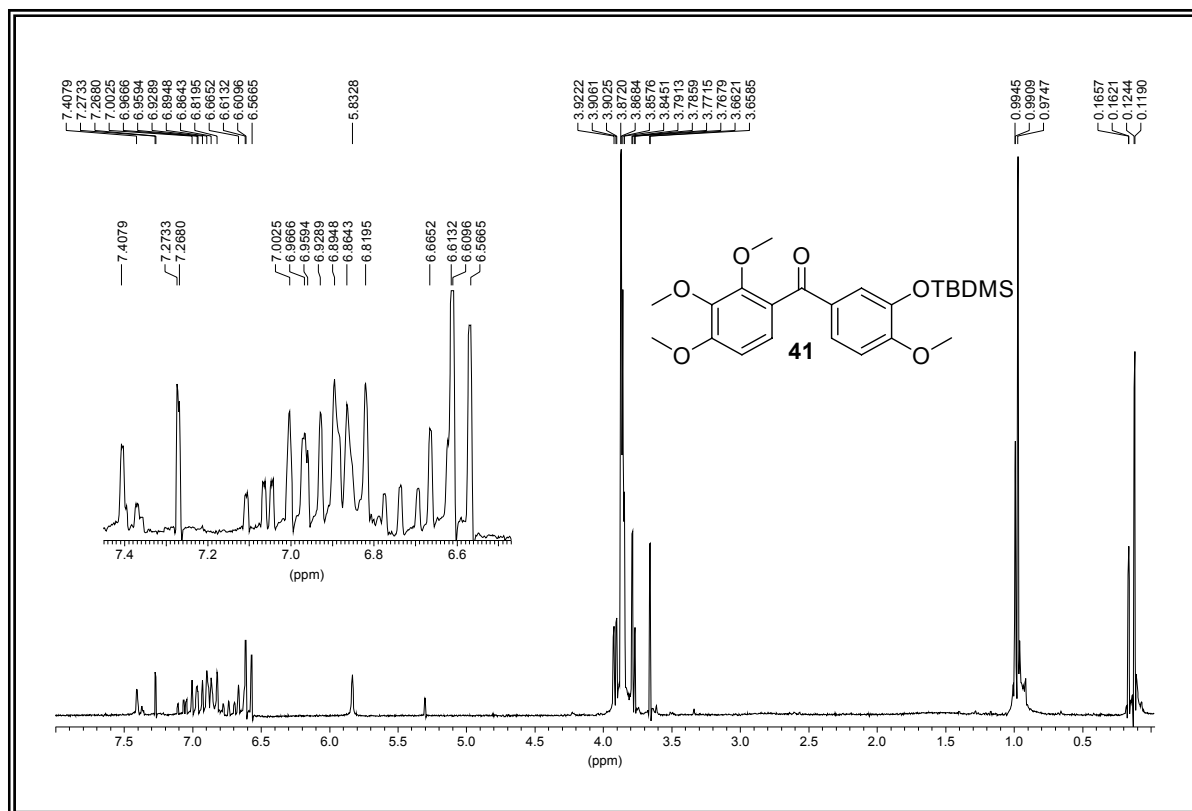


Figura XXIVa. Espectro de RMN ^1H del crudo de la reacción para la obtención del compuesto **41**.

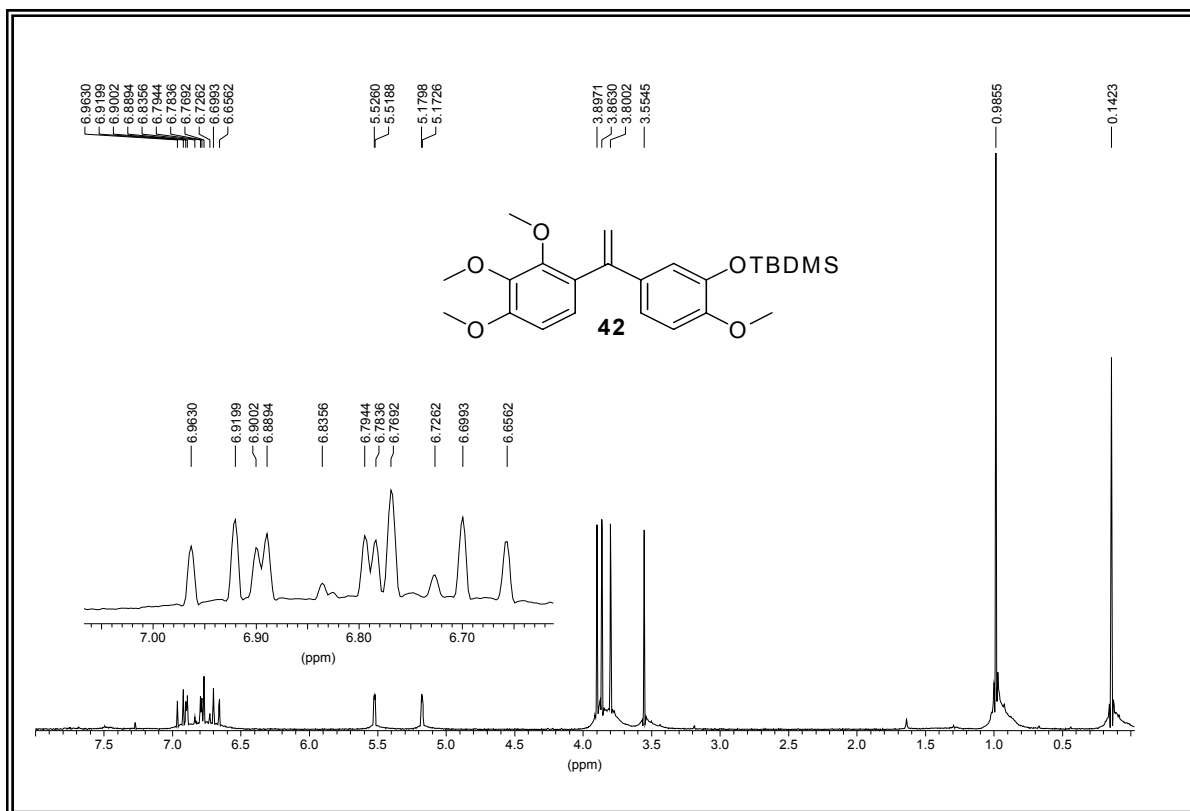


Figura XXVa. Espectro de RMN ^1H del compuesto 42.

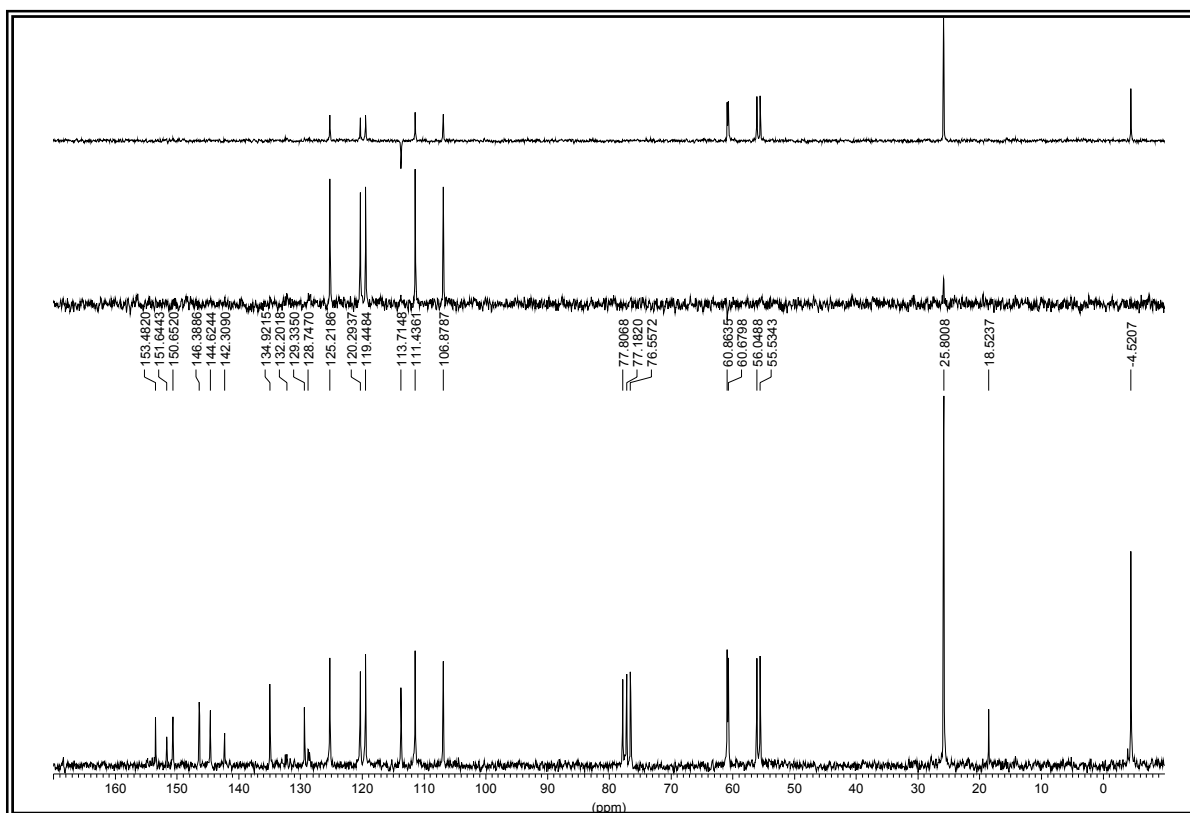


Figura XXVb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 42.

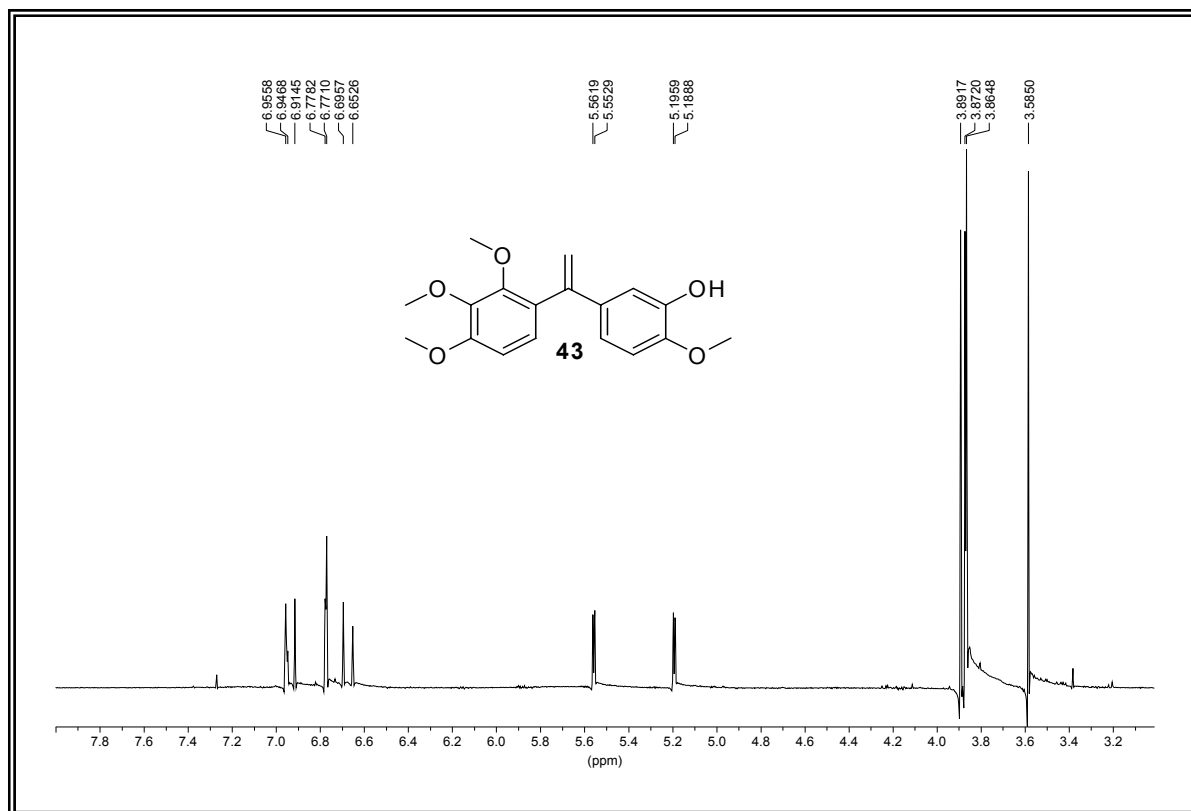


Figura XXVIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **43**.

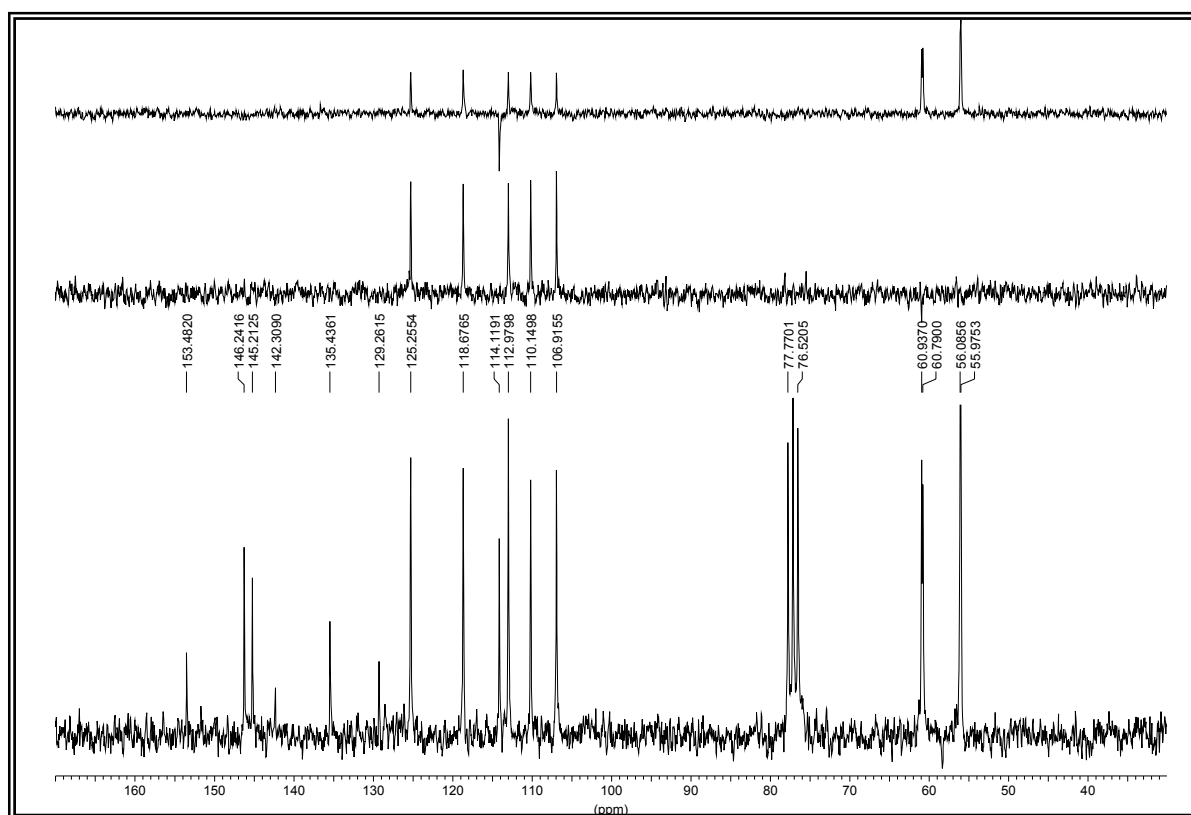


Figura XXVIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **43**.

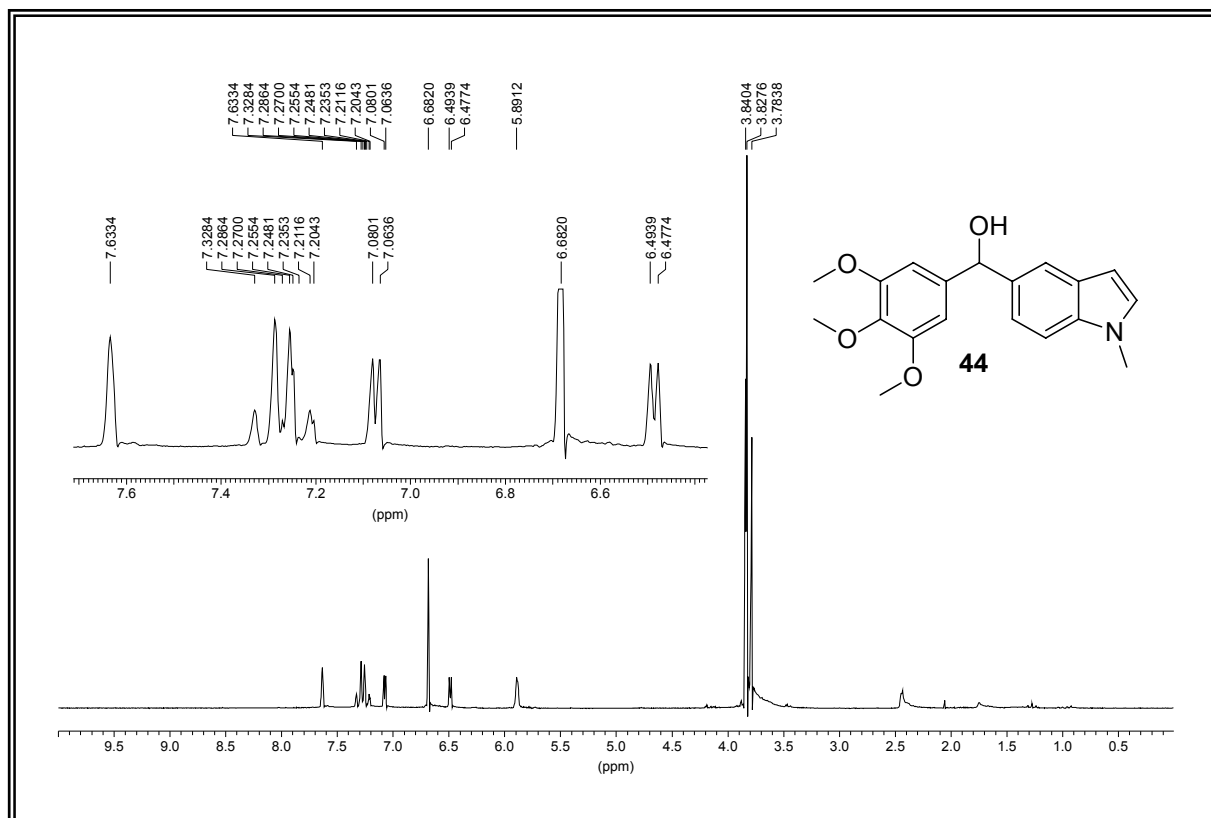


Figura XXVIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto 44.

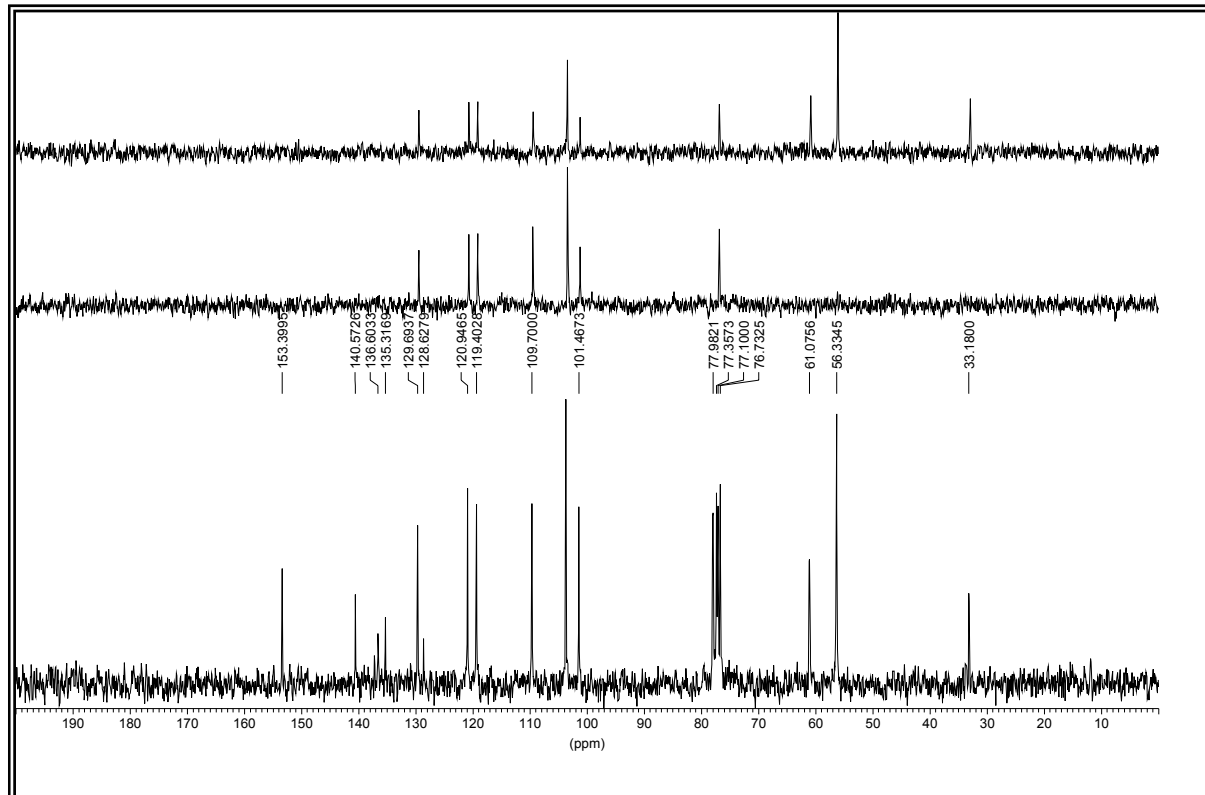


Figura XVIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 44.

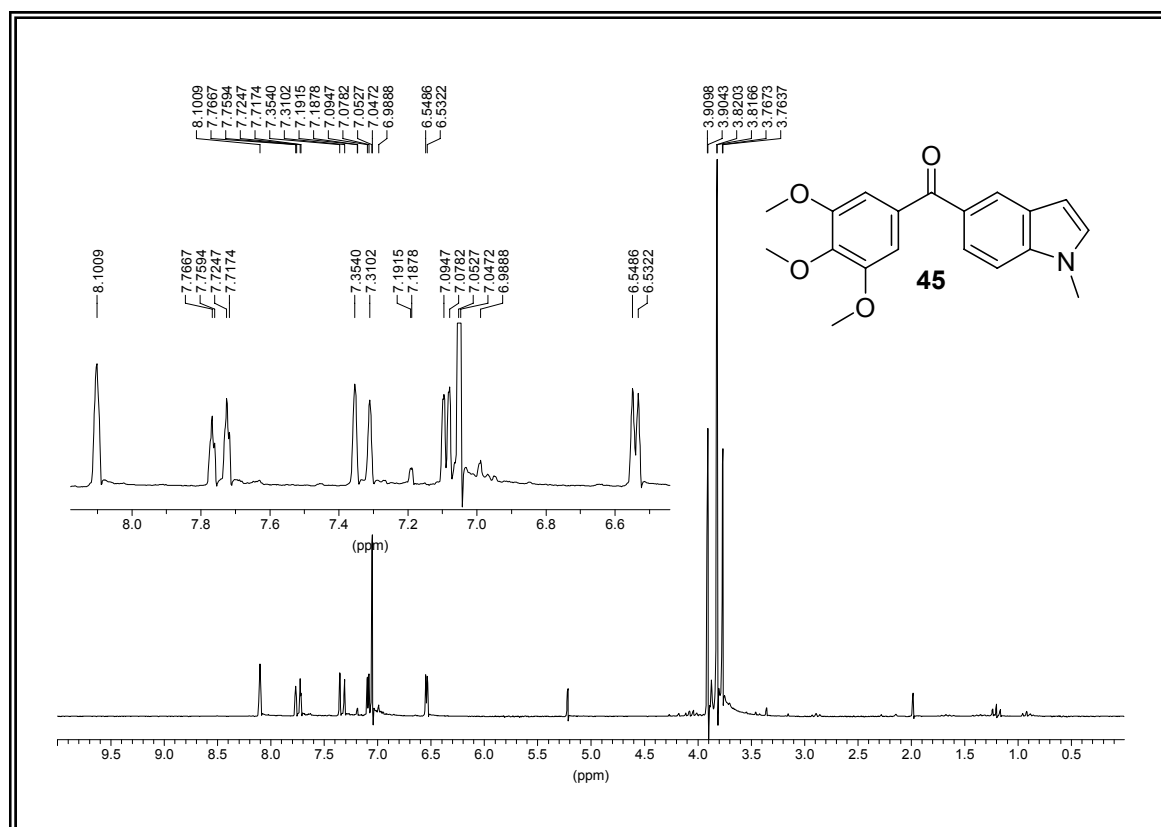


Figura XXVIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto 45.

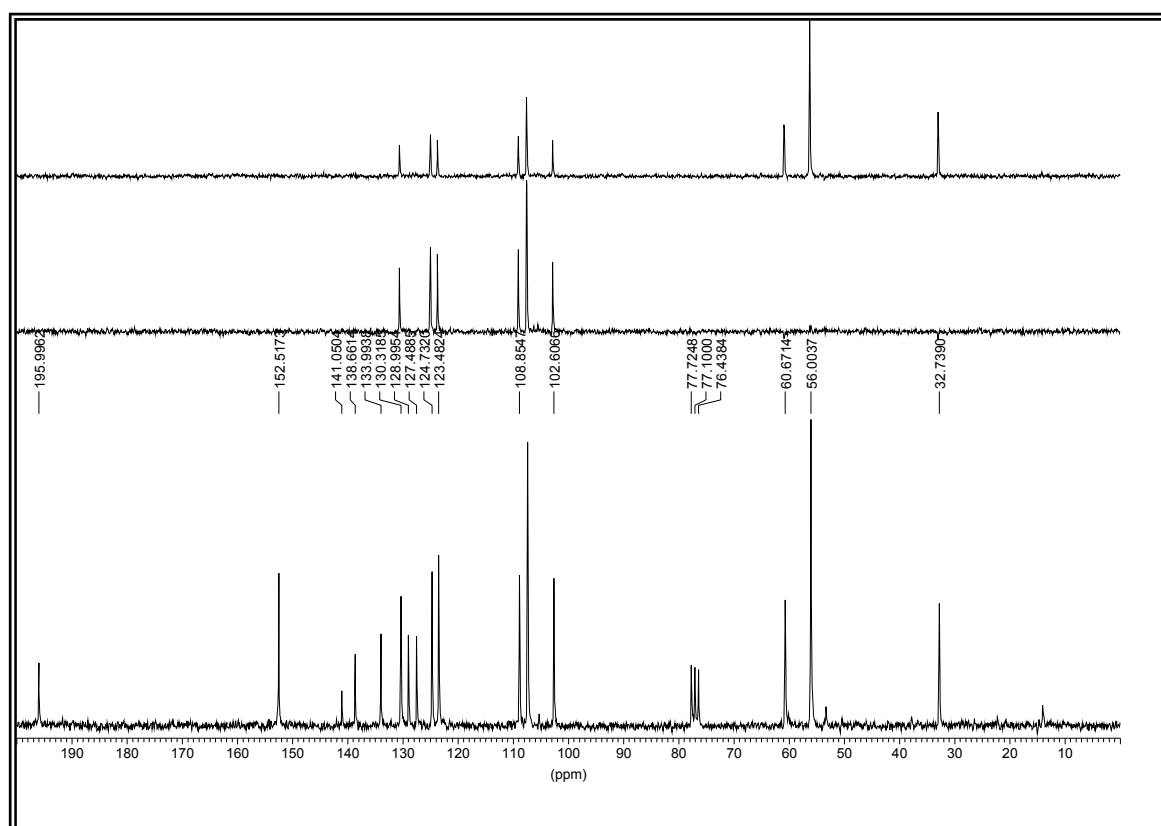


Figura XXVIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 45.

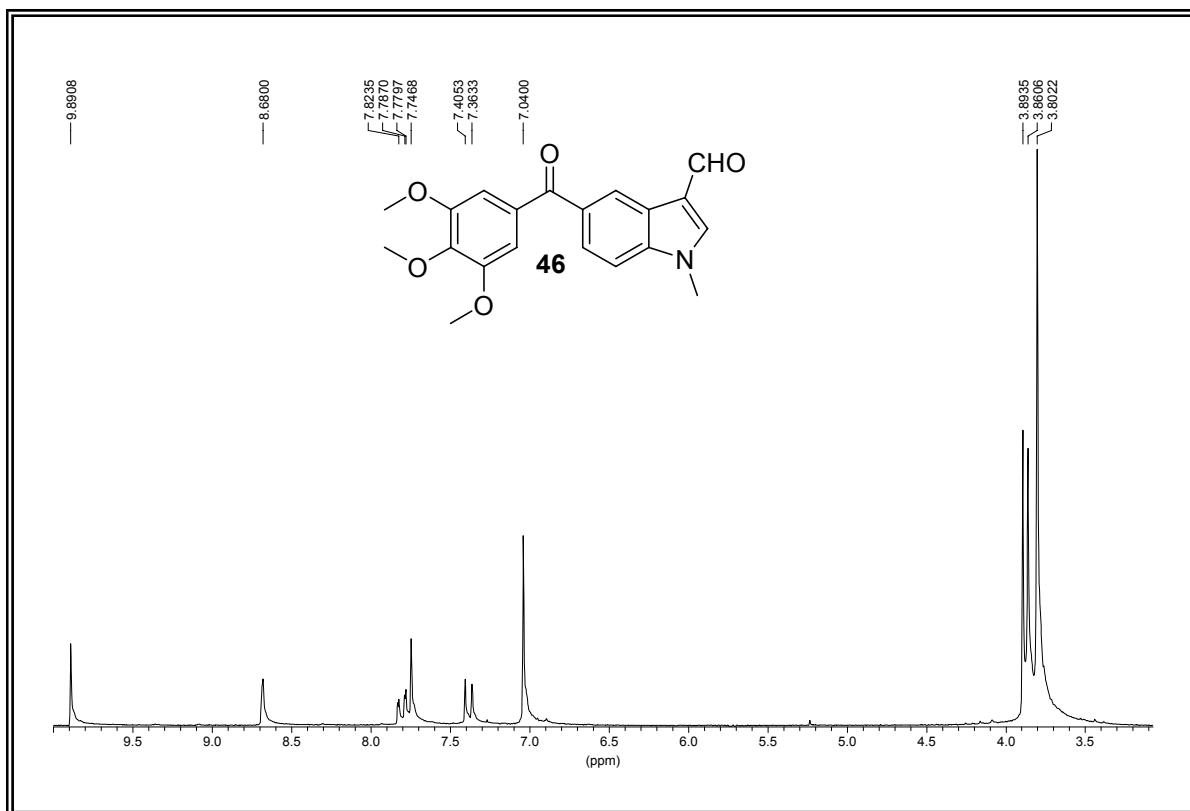


Figura XXIXa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **46**.

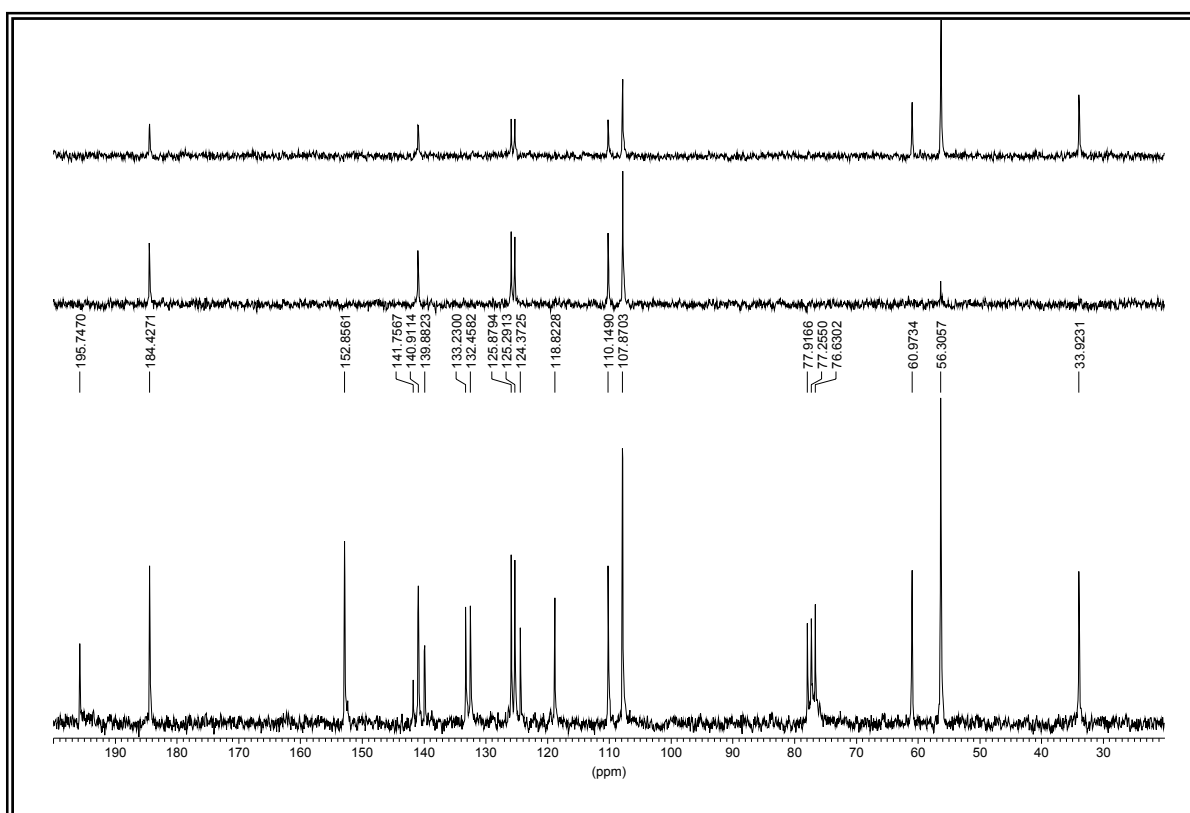


Figura XXIXb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **46**.

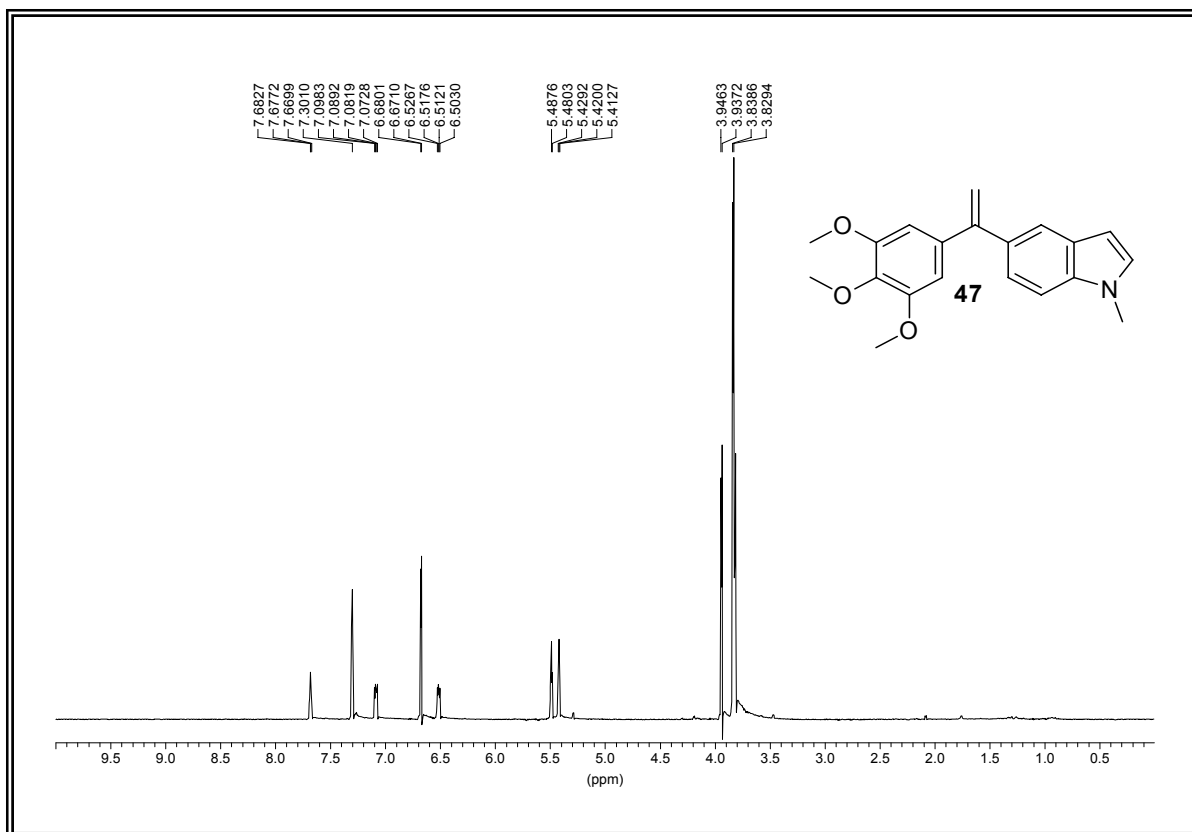


Figura XXXa. Espectro de RMN ^1H del compuesto 47.

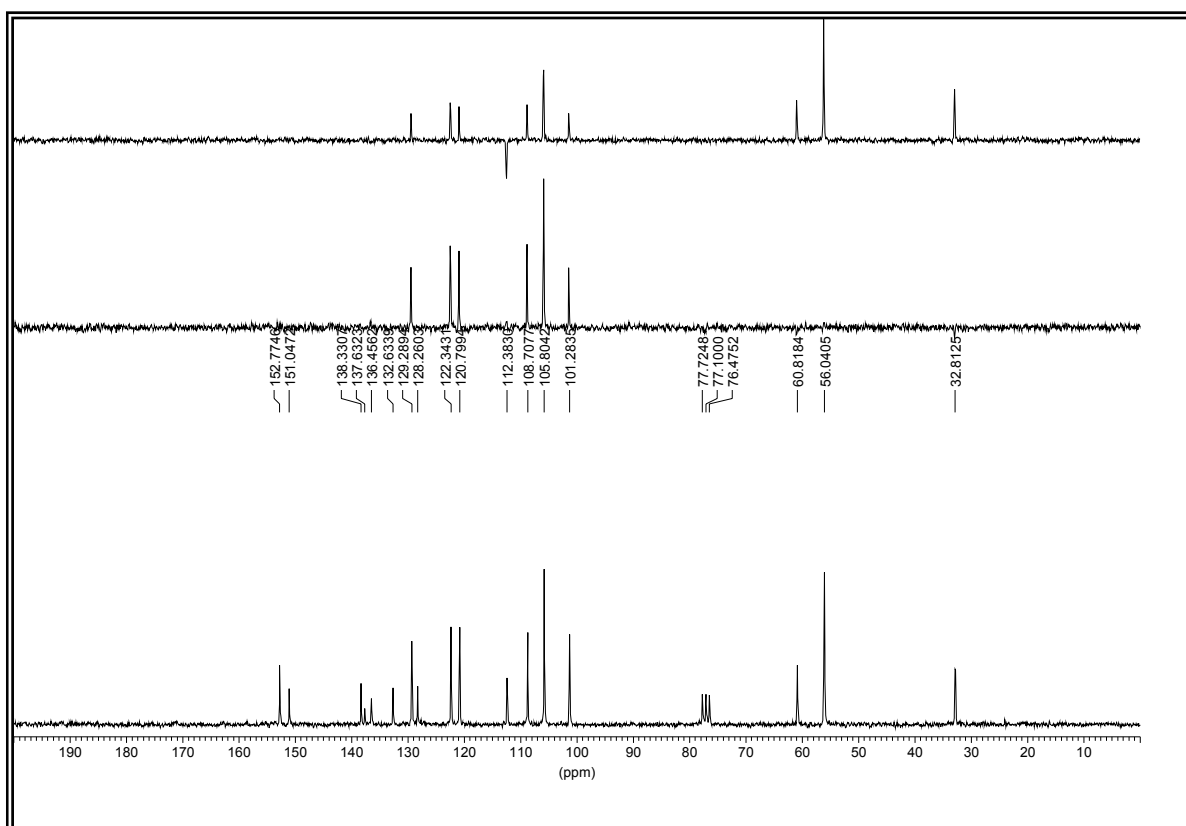


Figura XXXb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 47.

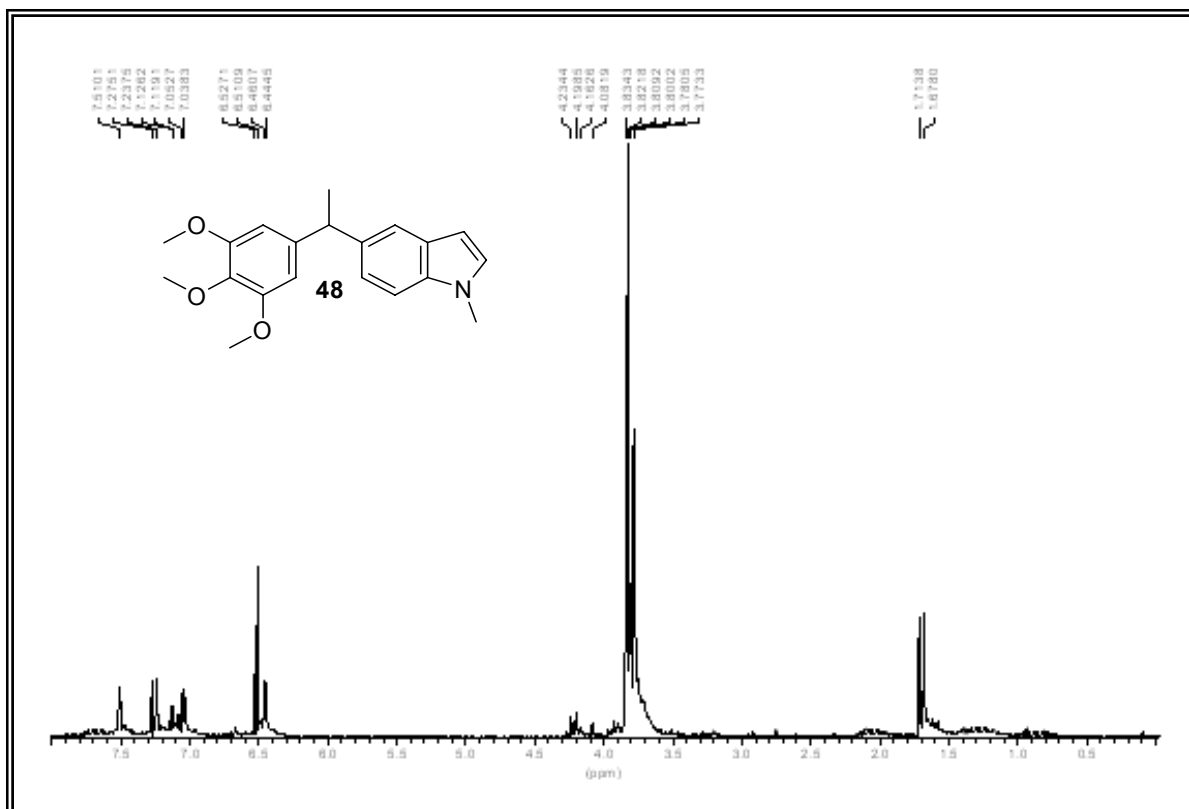


Figura XXXIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **48**.

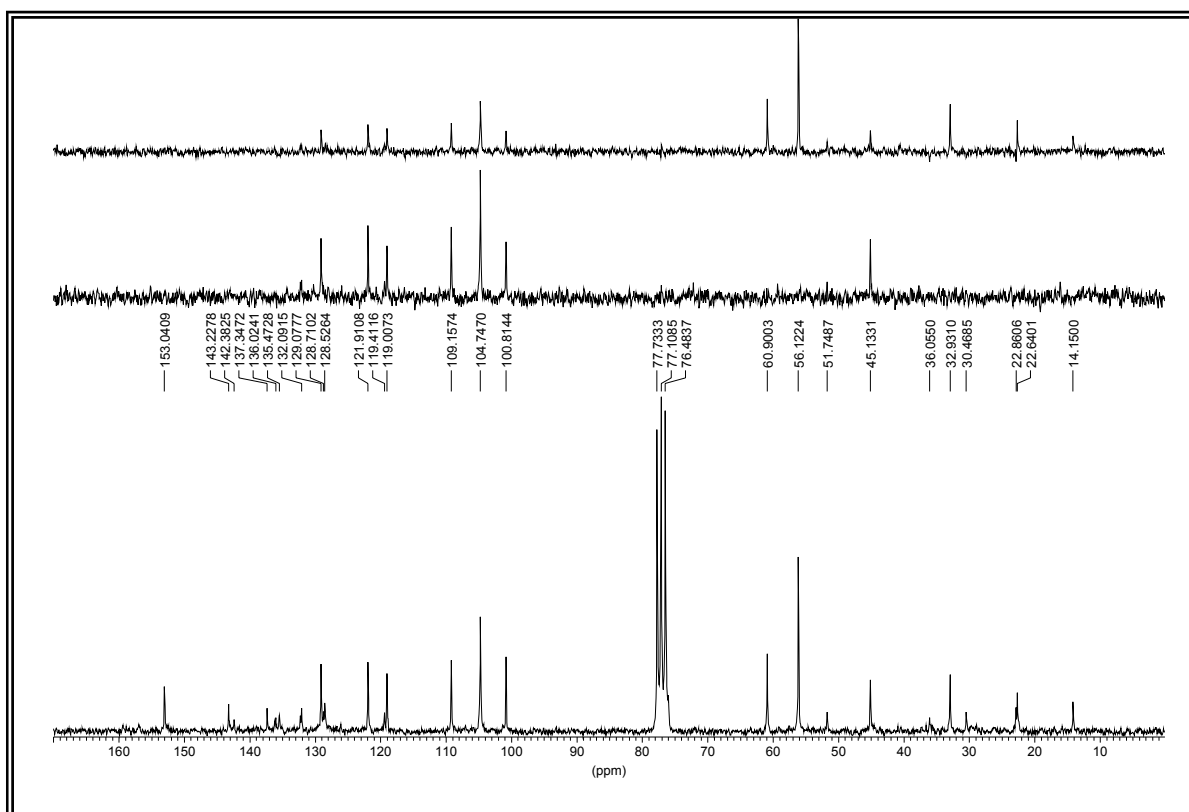


Figura XXXIb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **48**.

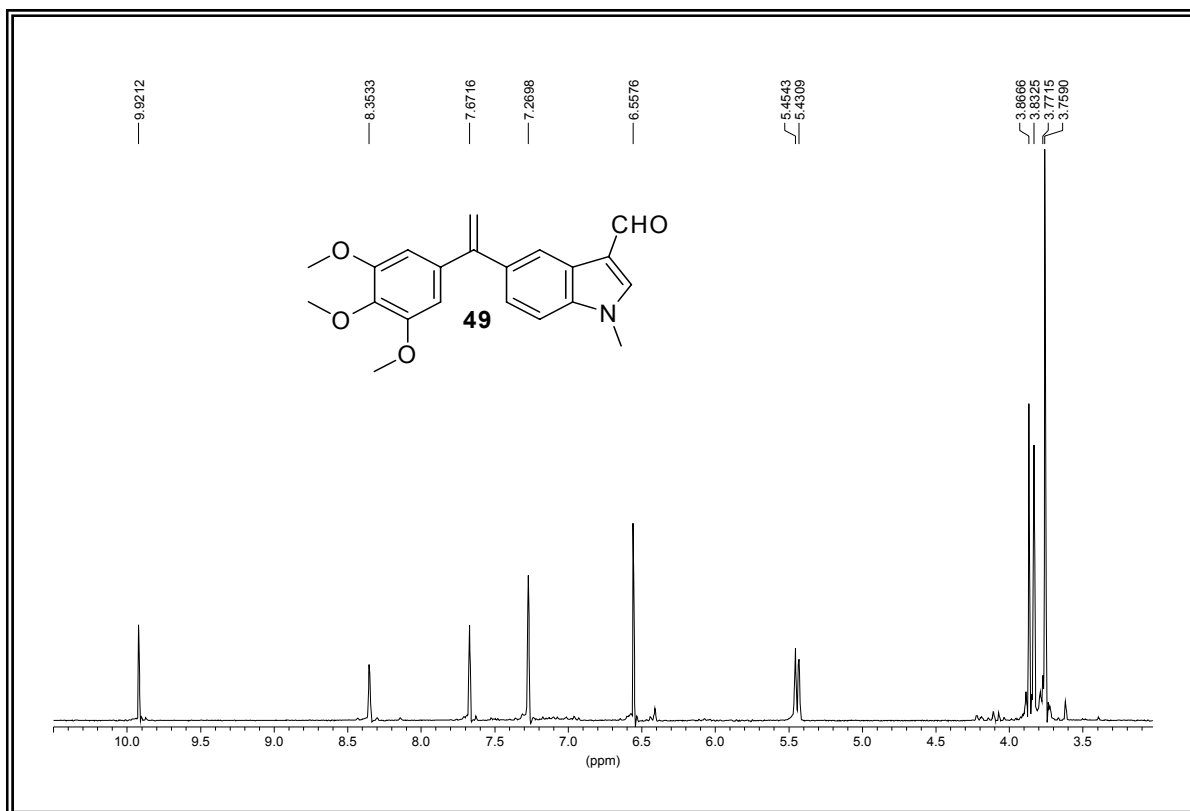


Figura XXXIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **49**.

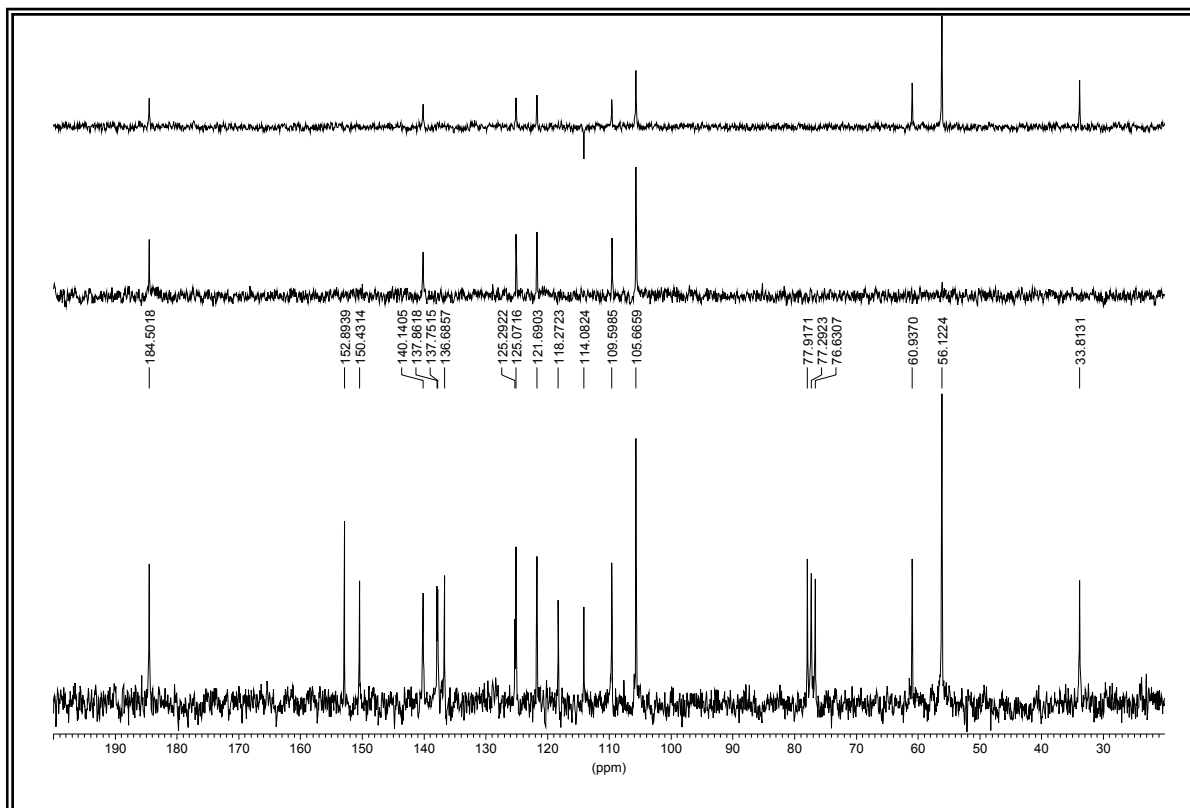


Figura XXXIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **49**.

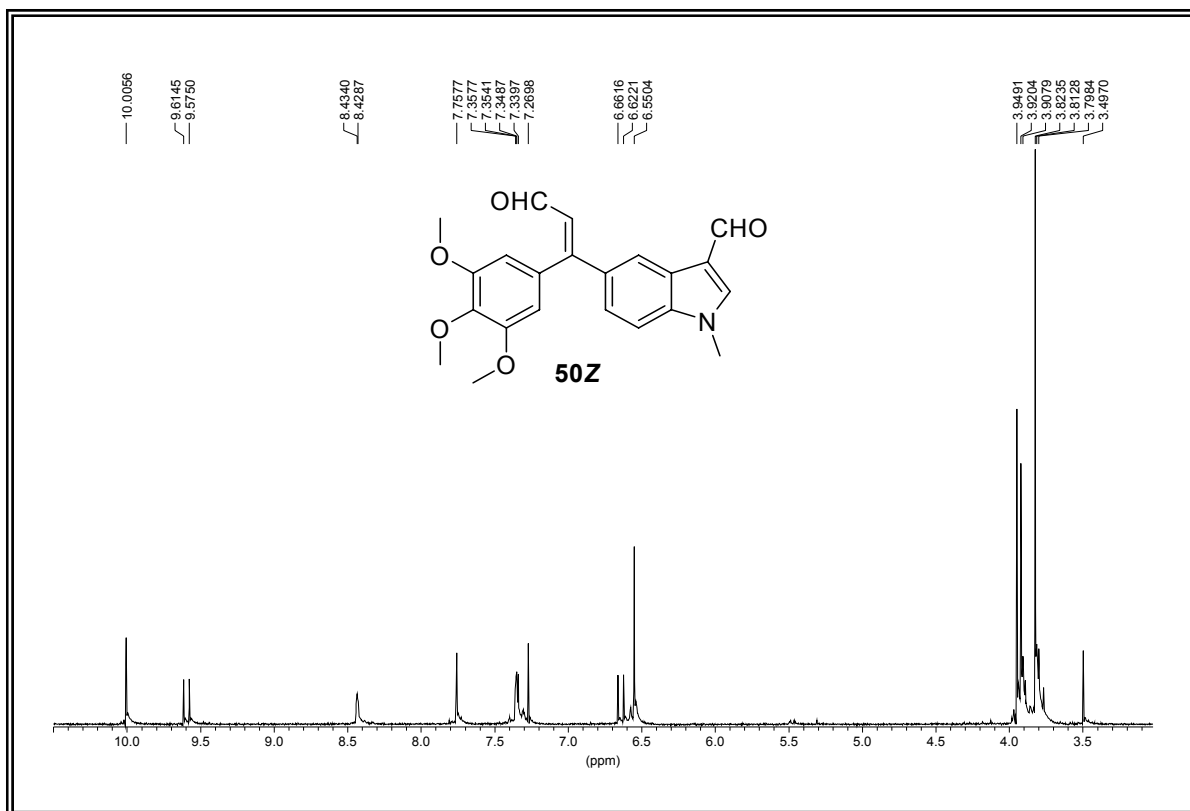


Figura XXXIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **50Z**.

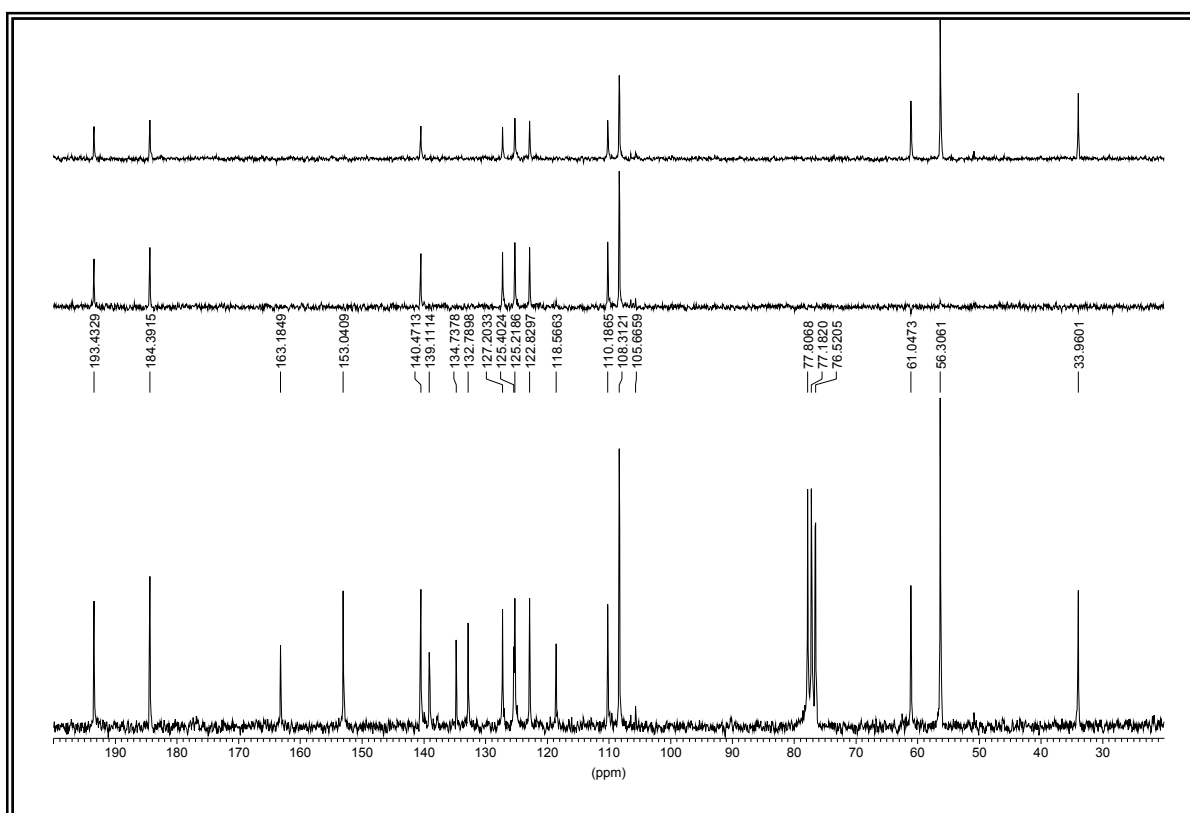


Figura XXXIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **50Z**.

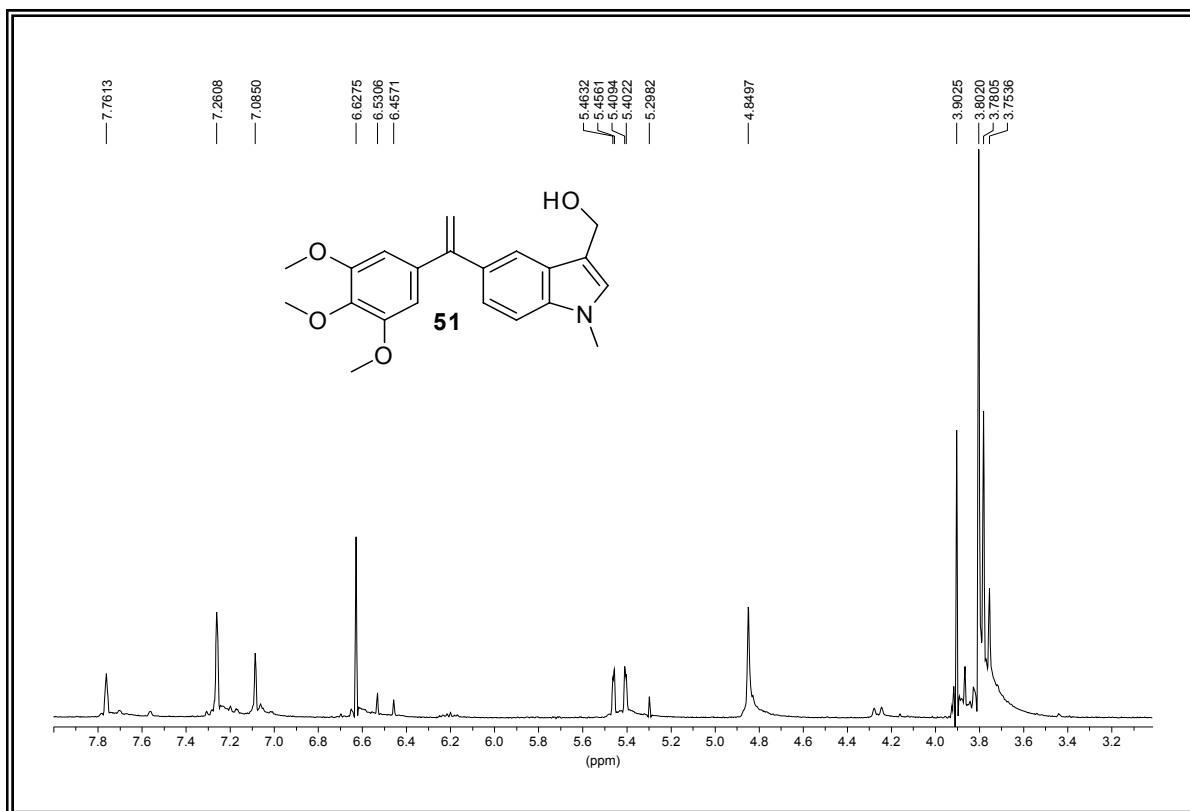


Figura XXXIVa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **51**.

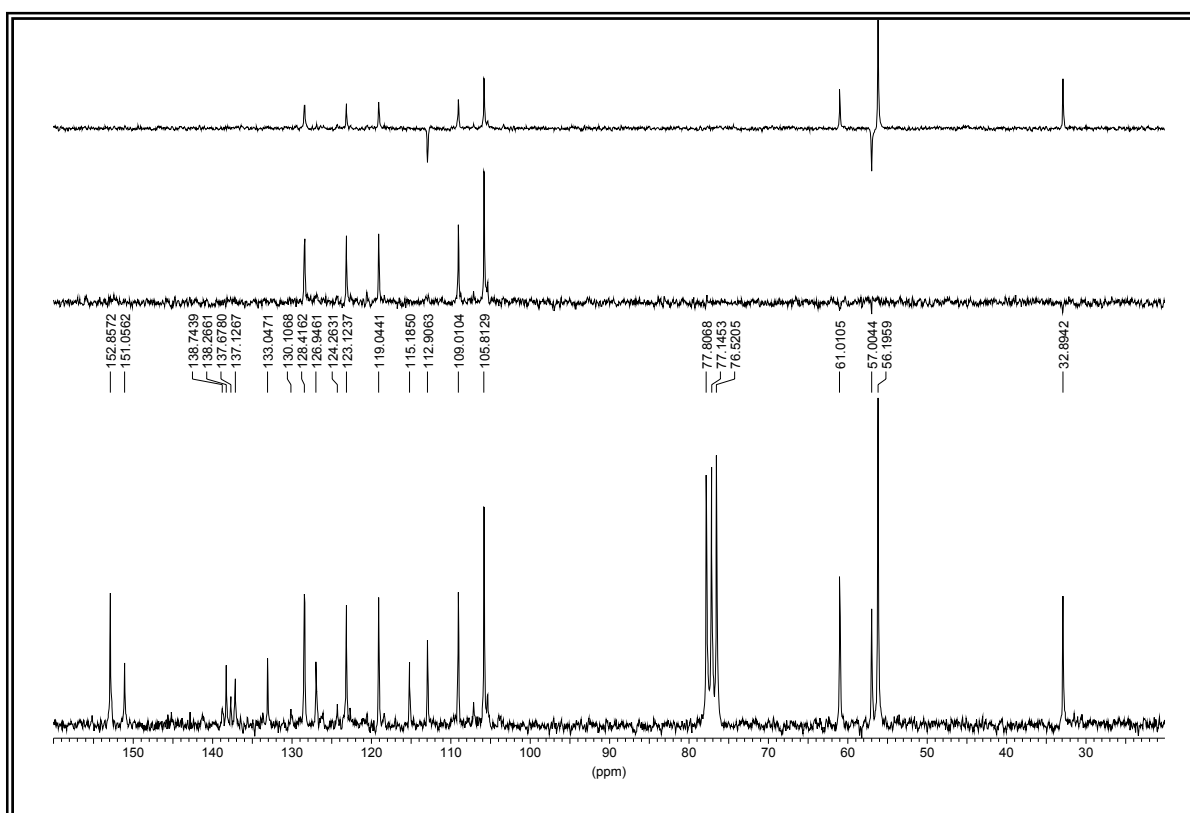


Figura XXXIVb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **51**.

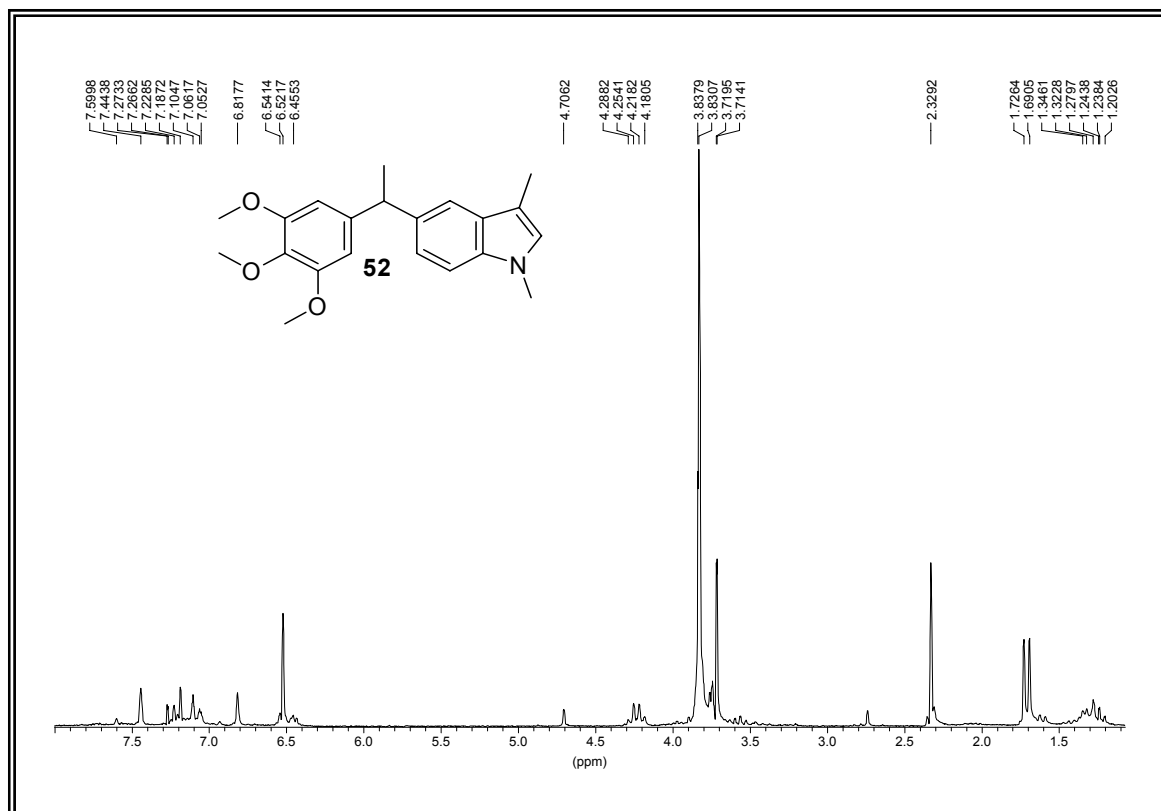


Figura XXXVa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **52**.

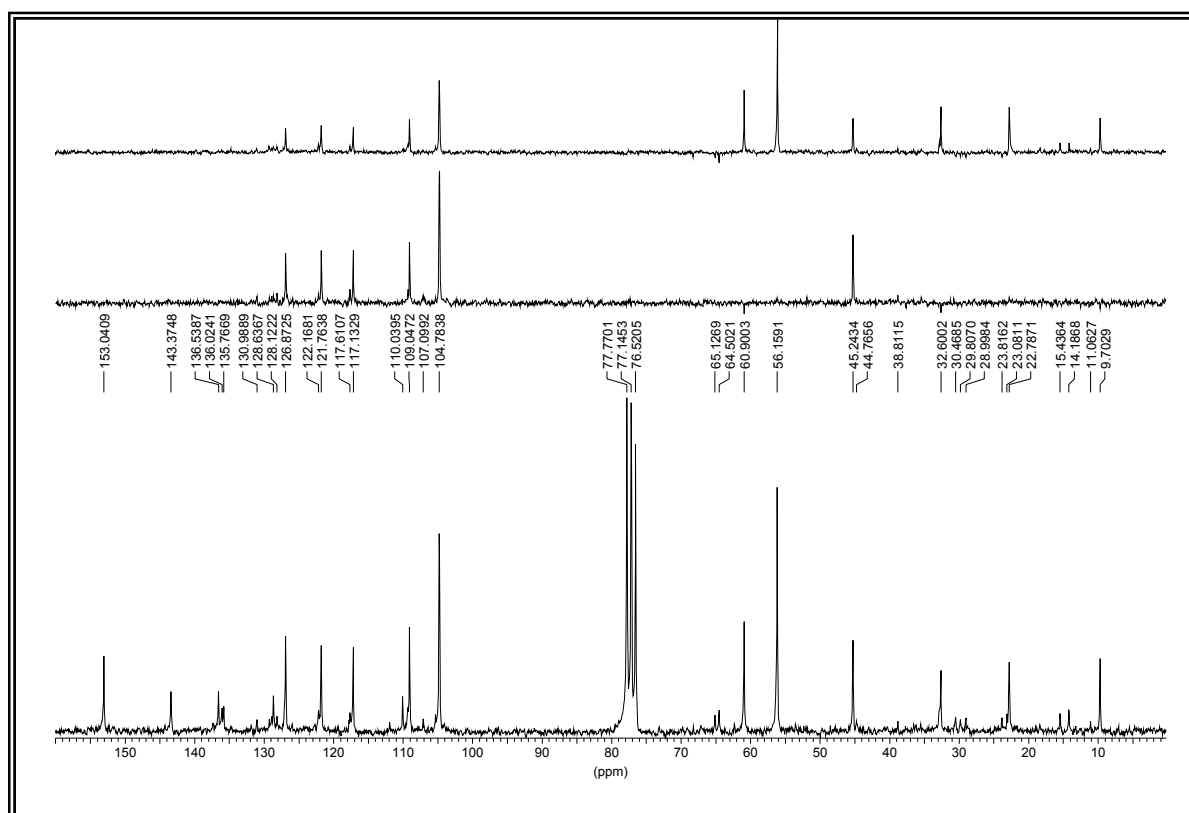


Figura XXXVb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **52**.

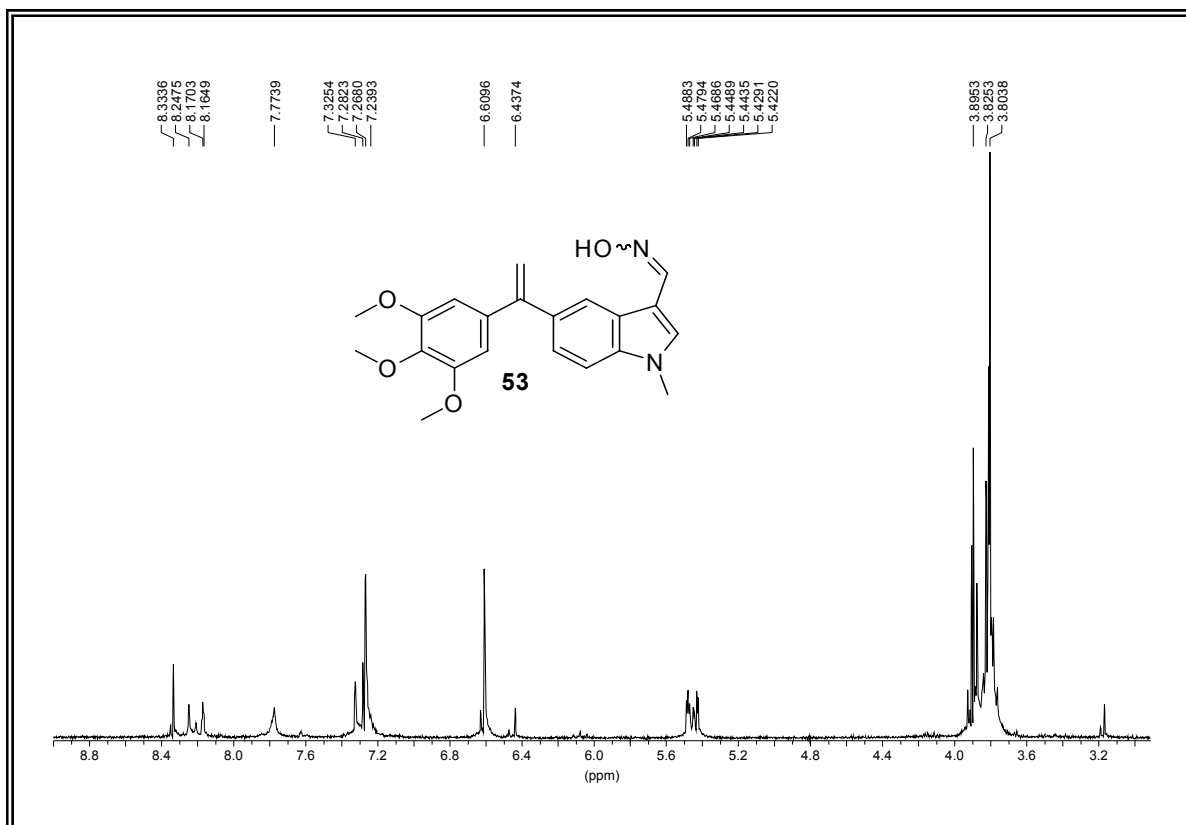


Figura XXXVIa. Espectro de RMN ¹H de los compuestos **53Z** y **53E**.

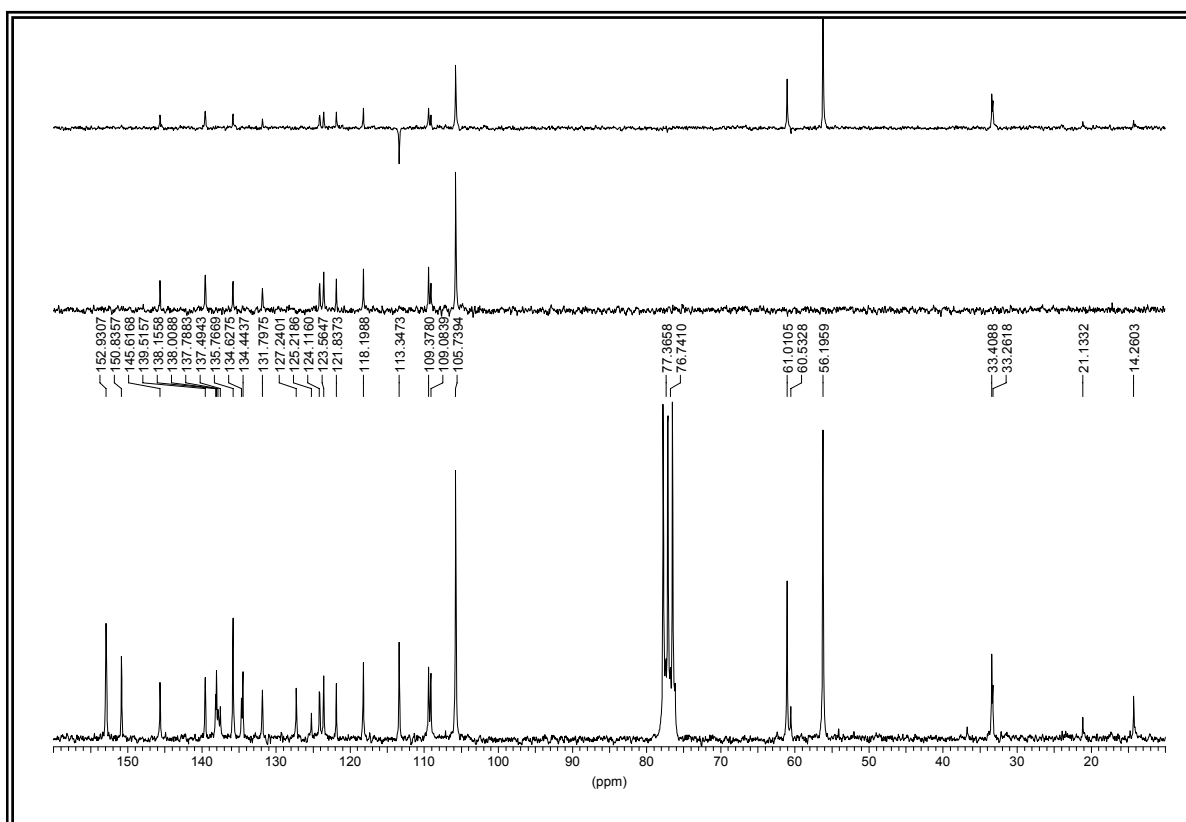


Figura XXXVIb. Espectro de RMN ¹³C de los compuestos **53Z** y **53E**.

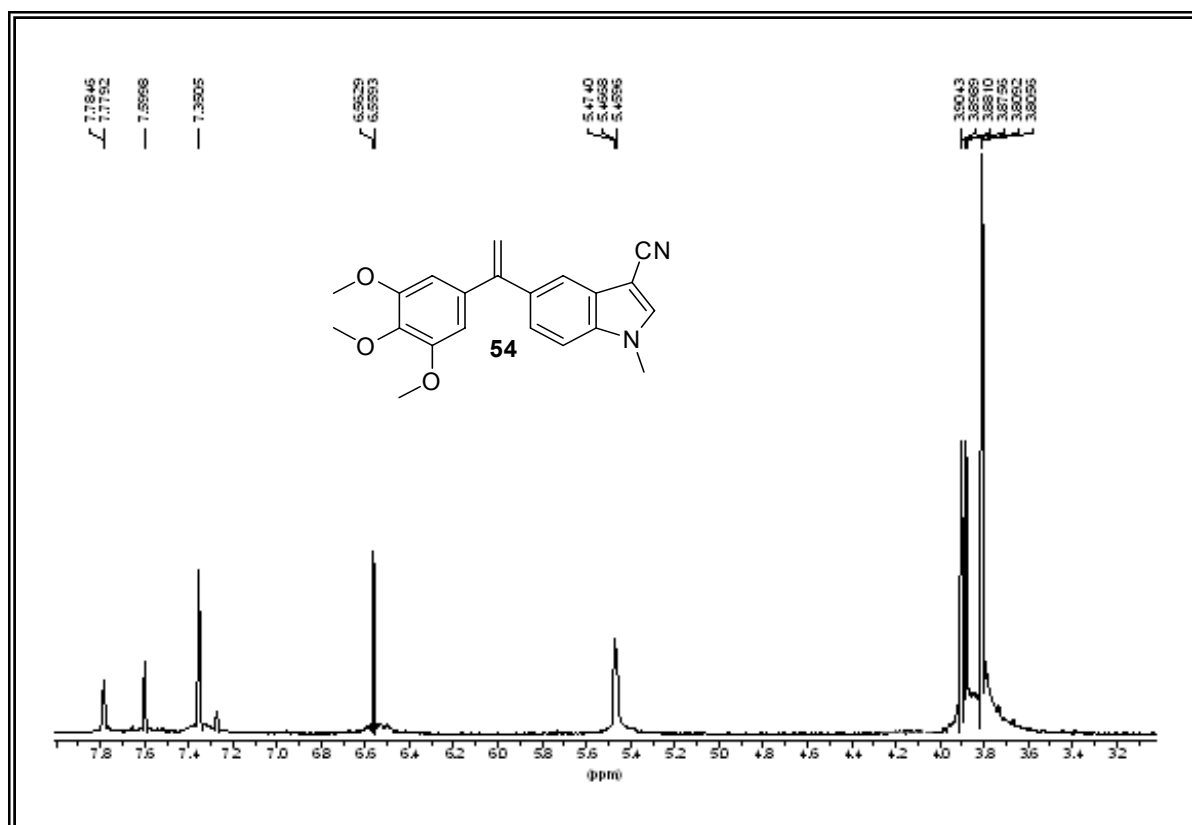


Figura XXXVIIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto 54.

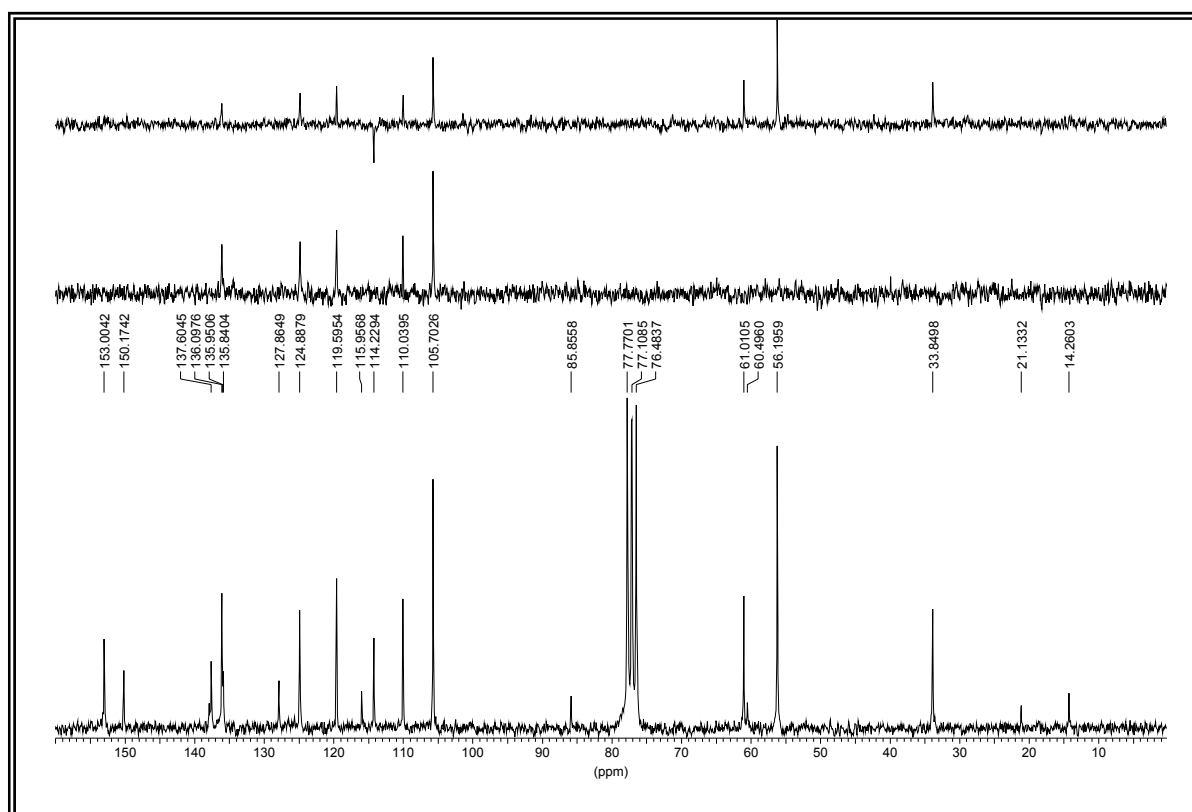


Figura XXXVIIb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto 54.

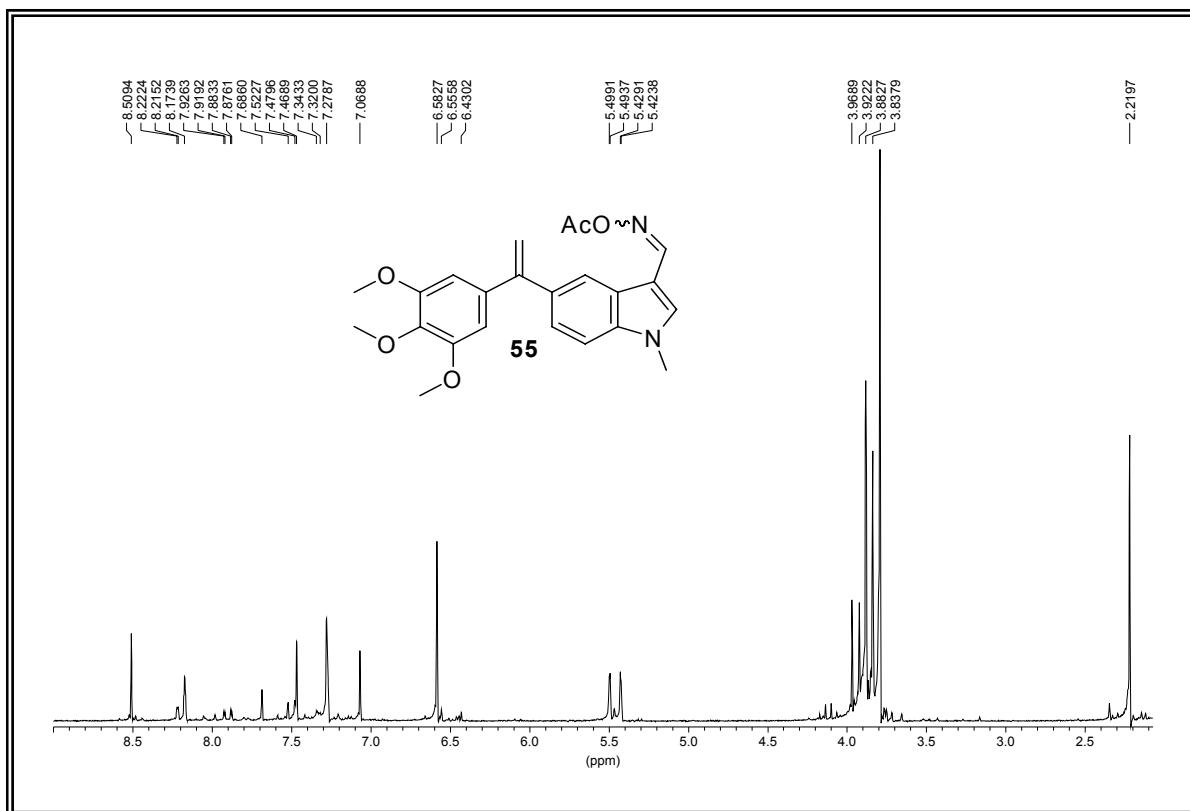


Figura XXXVIIIa. Espectro de RMN ¹H de los compuestos **55Z** y **55E**. (un isómero mayoritario)

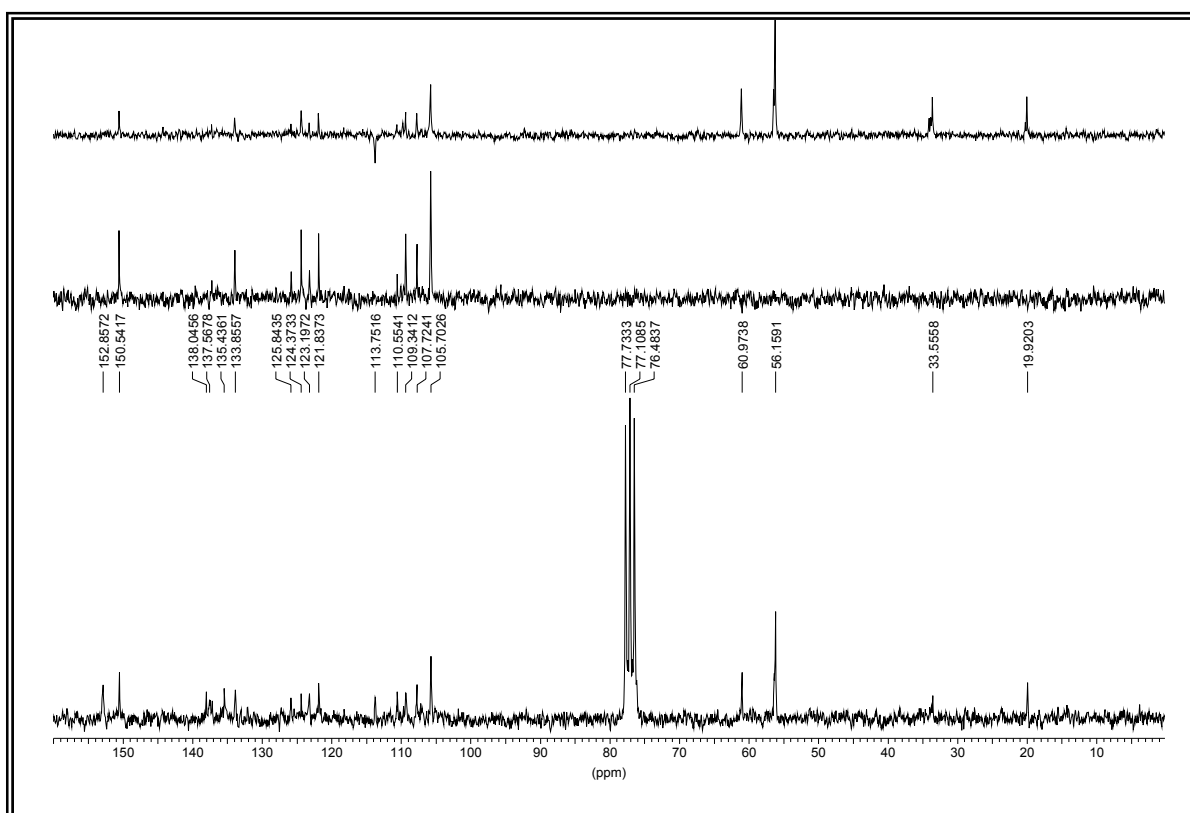


Figura XXXVIIIb. Espectro de RMN ¹³C de los compuestos **55Z** y **55E**. (un isómero mayoritario)

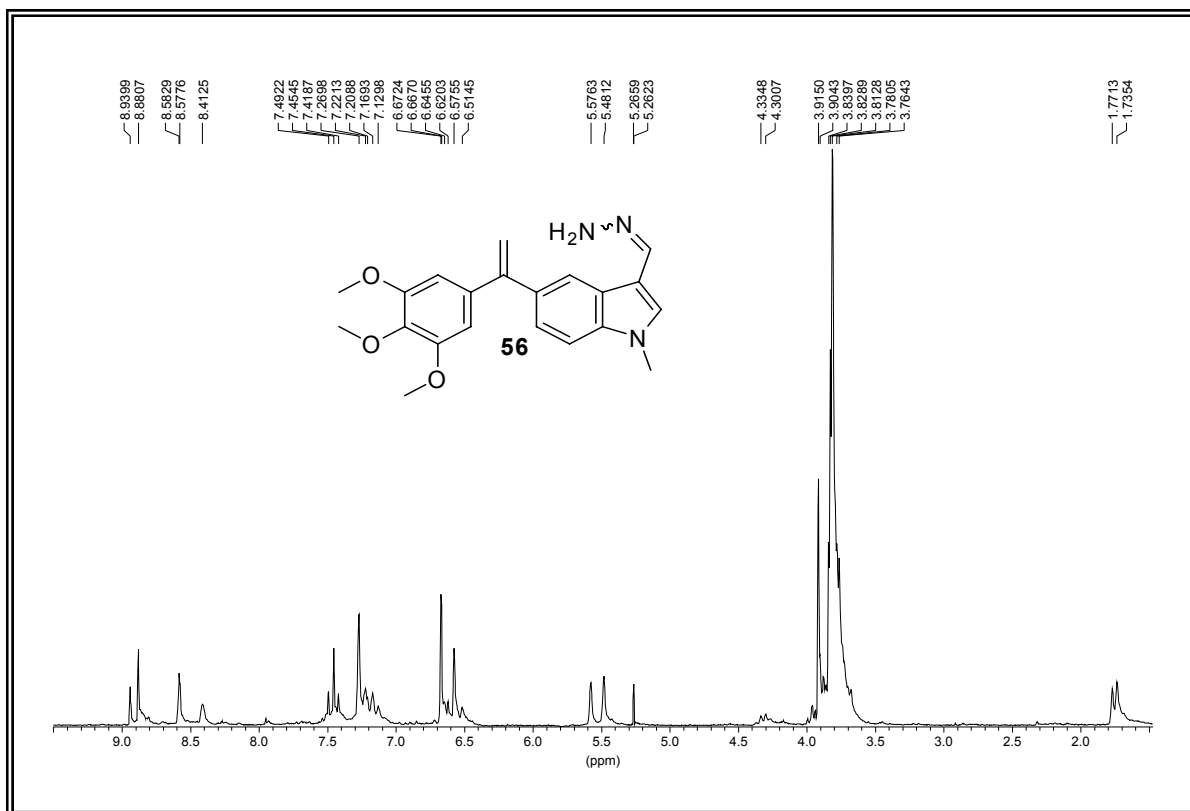


Figura XXXIXa. Espectro de RMN ¹H de los compuestos **56Z** y **56E**.

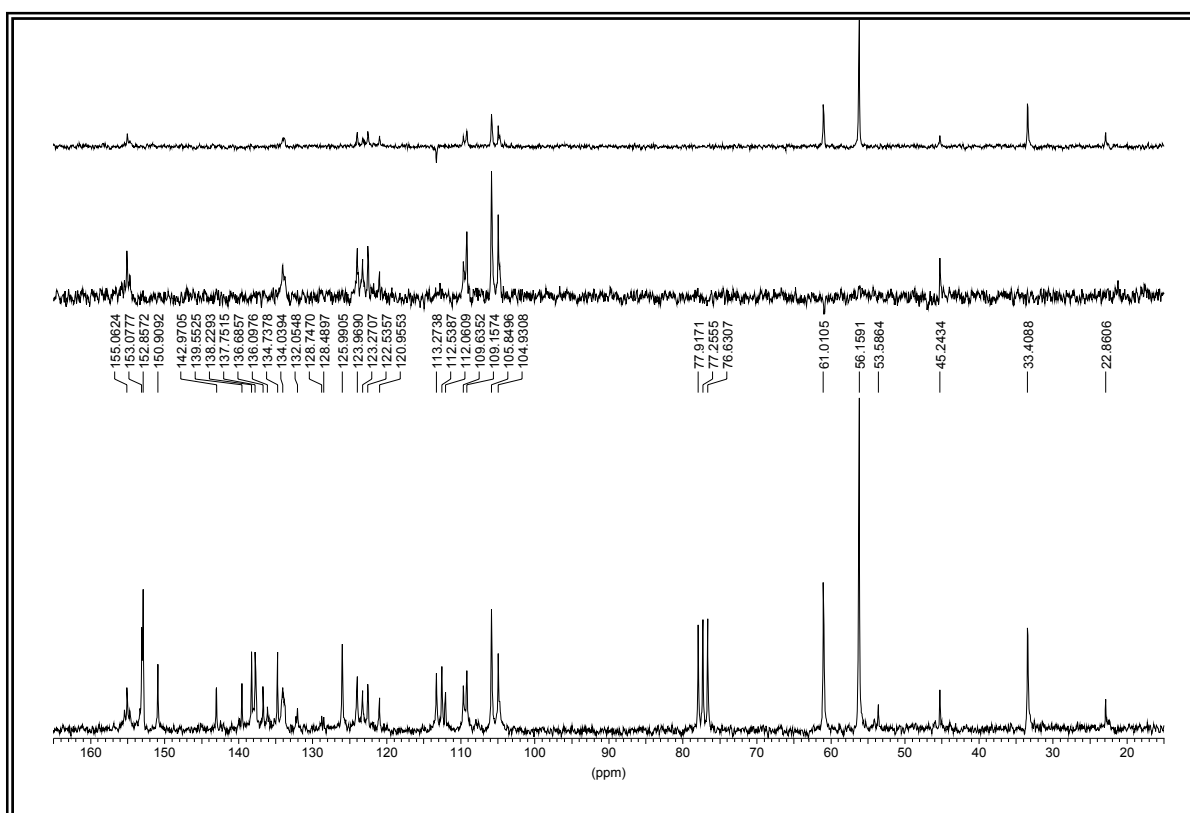


Figura XXXIXb. Espectro de RMN ¹³C de los compuestos **56Z** y **56E**.

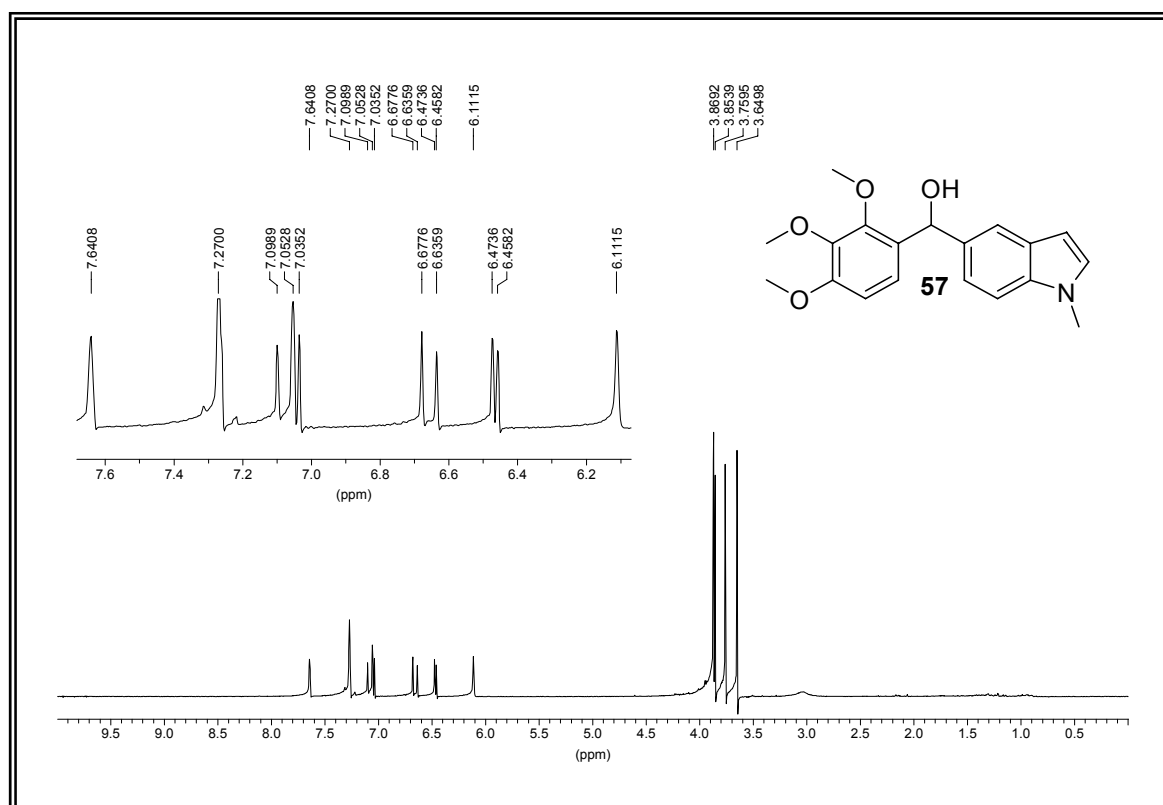


Figura XLa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **57**.

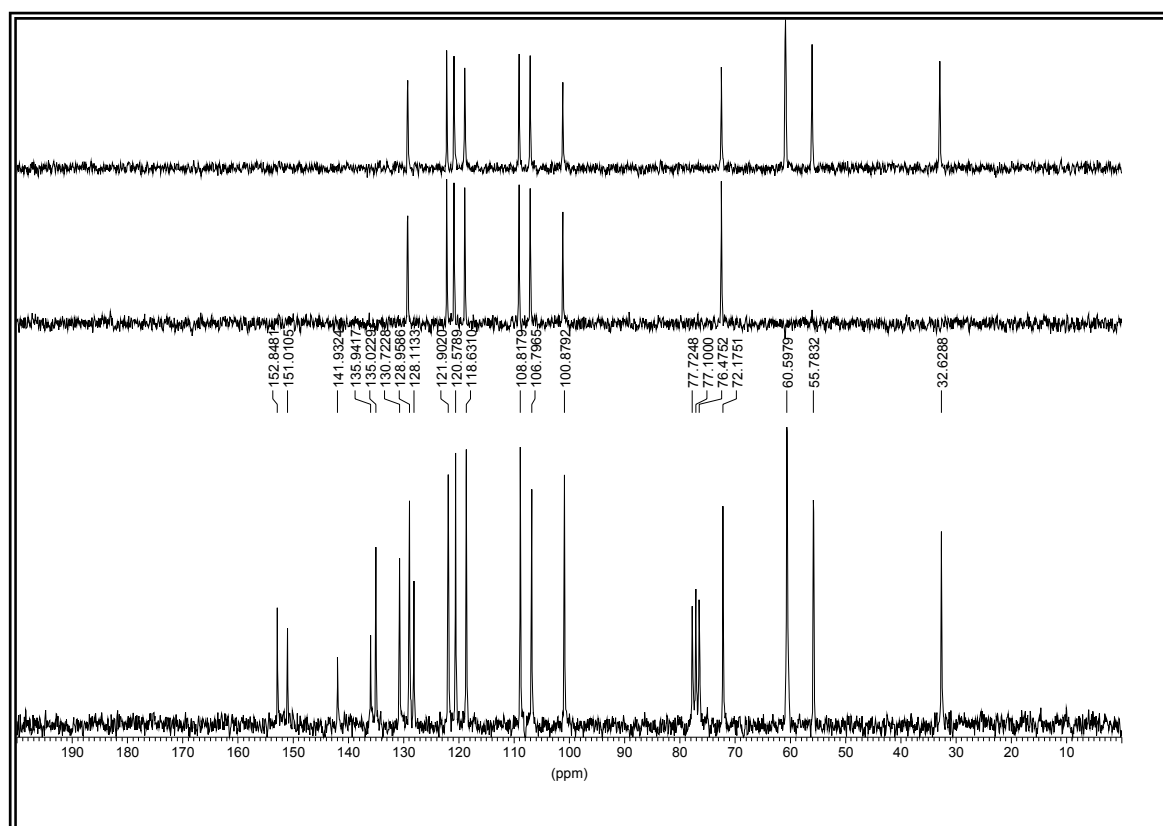


Figura XLb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **57**.

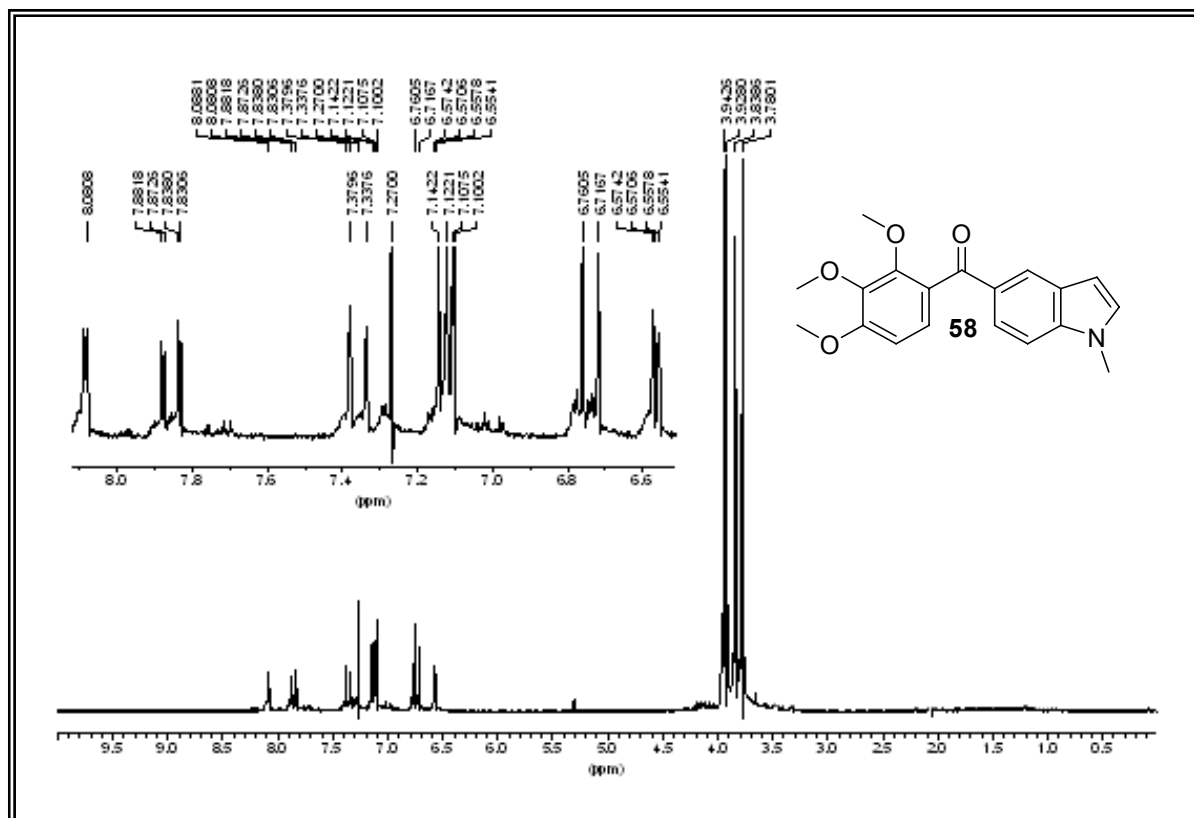


Figura XLIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **58**.

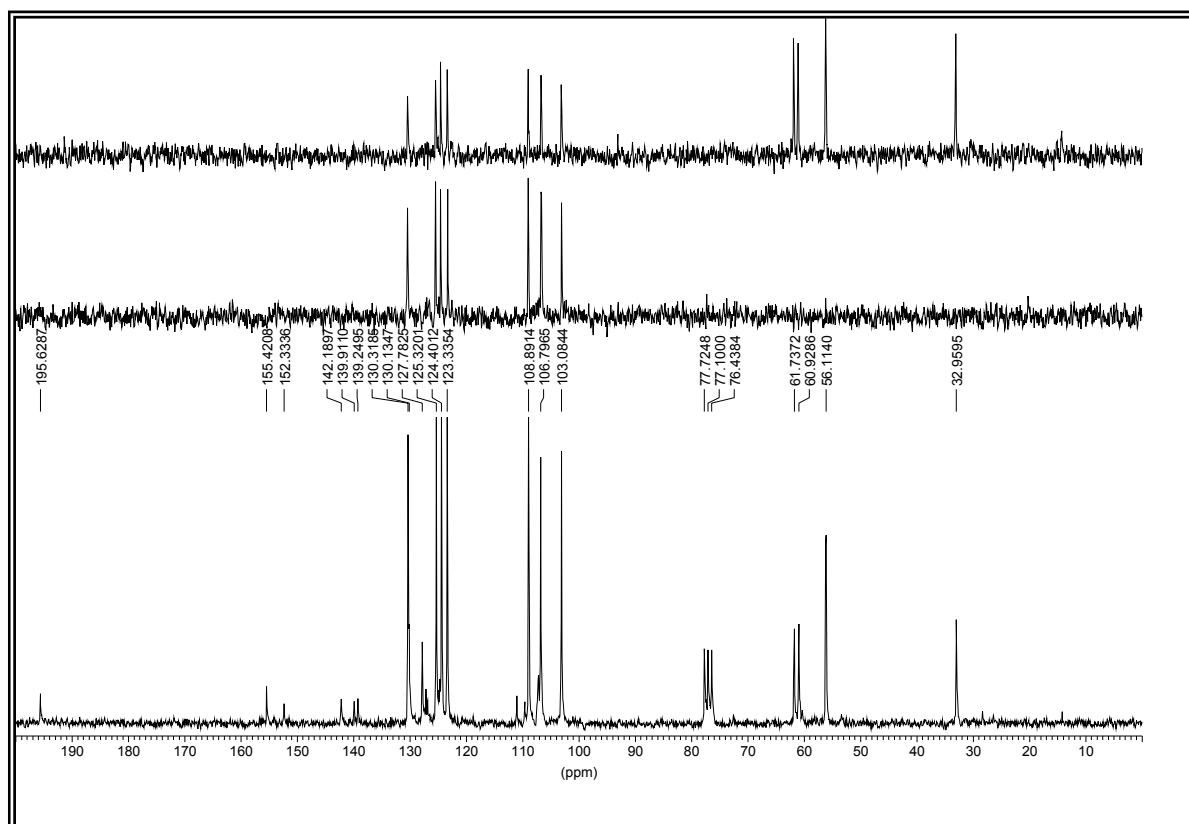


Figura XLIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **58**.

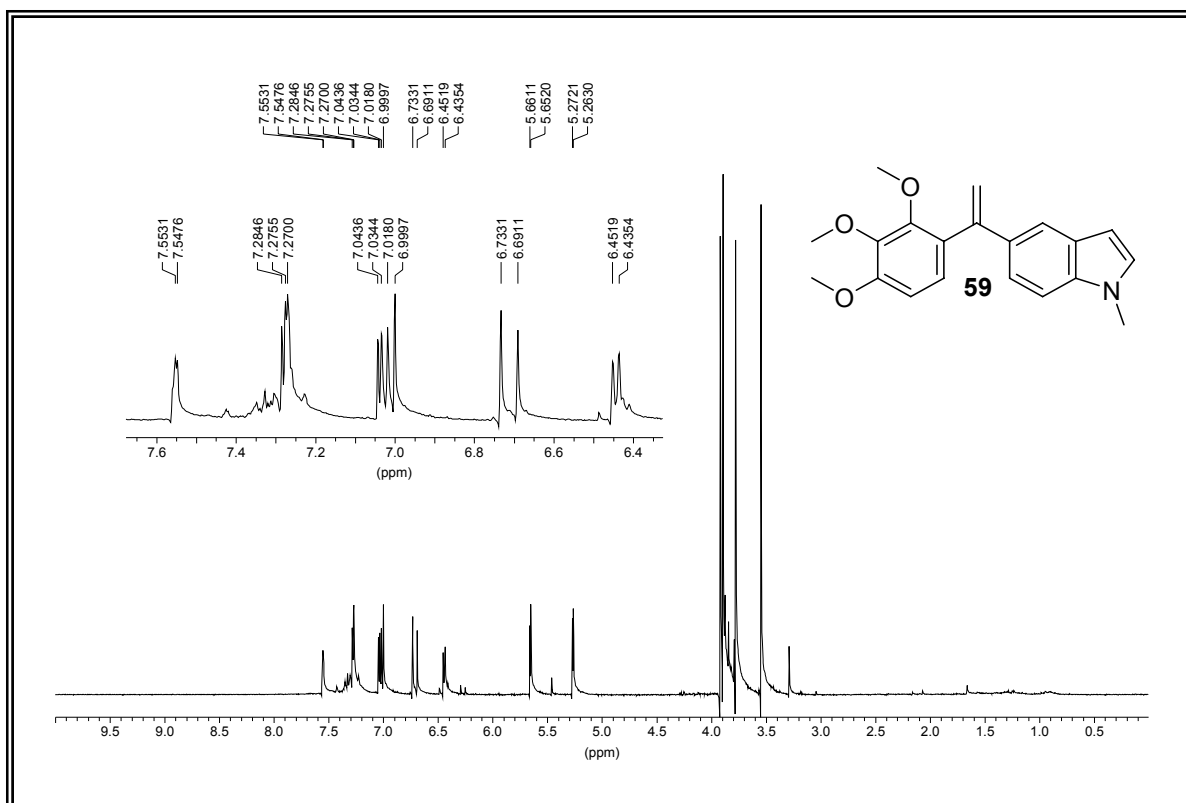


Figura XLIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **59**.

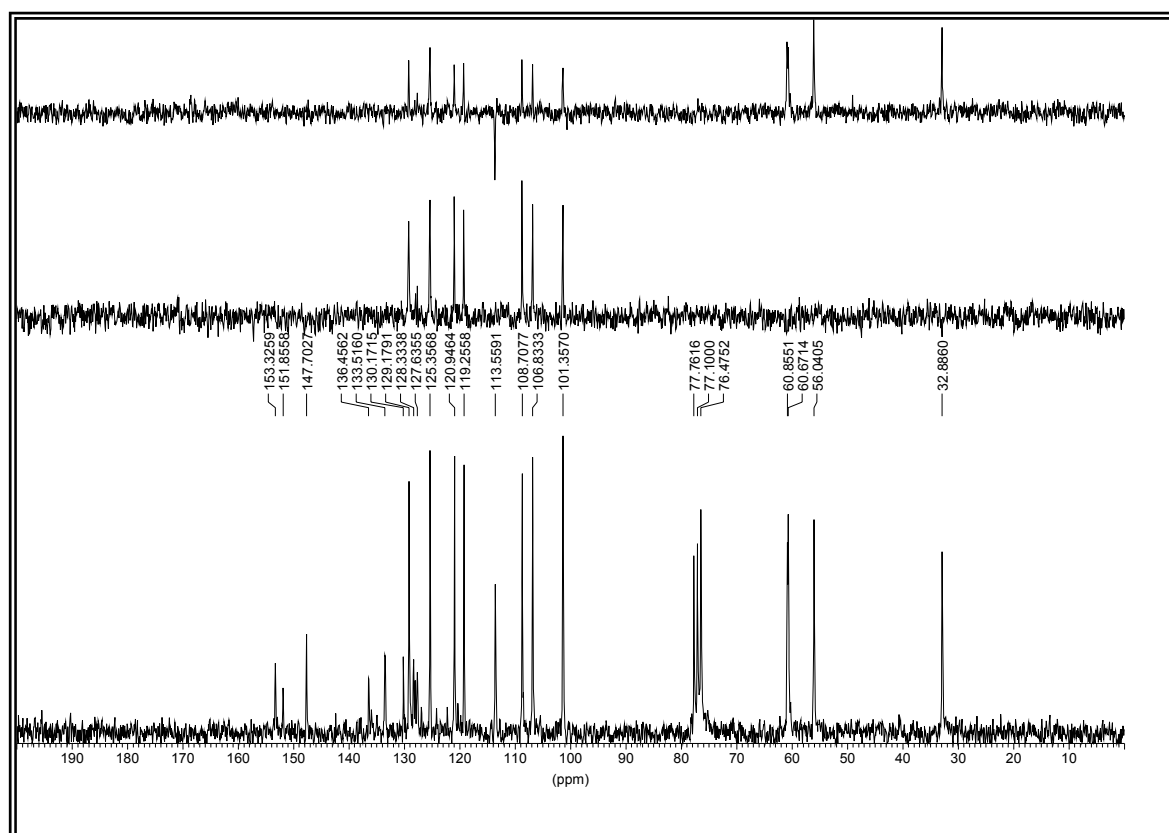


Figura XLIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **59**.

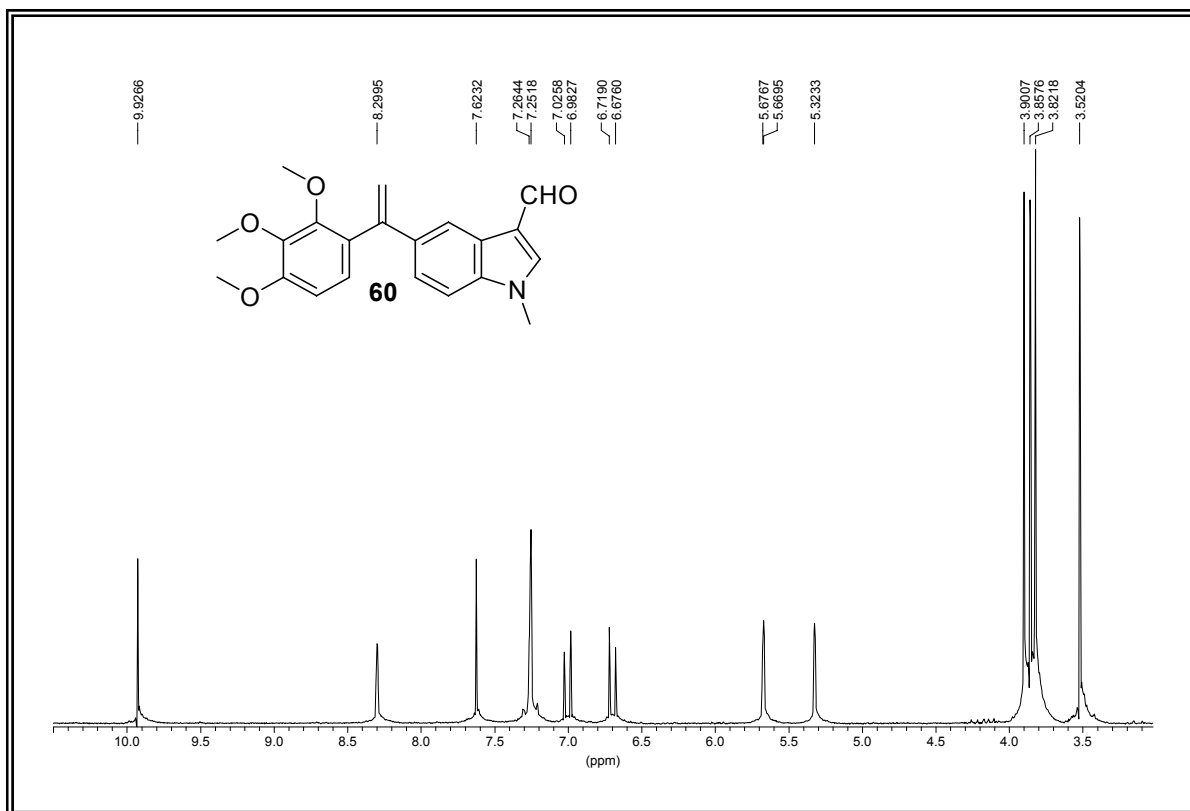


Figura XLIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **60**.

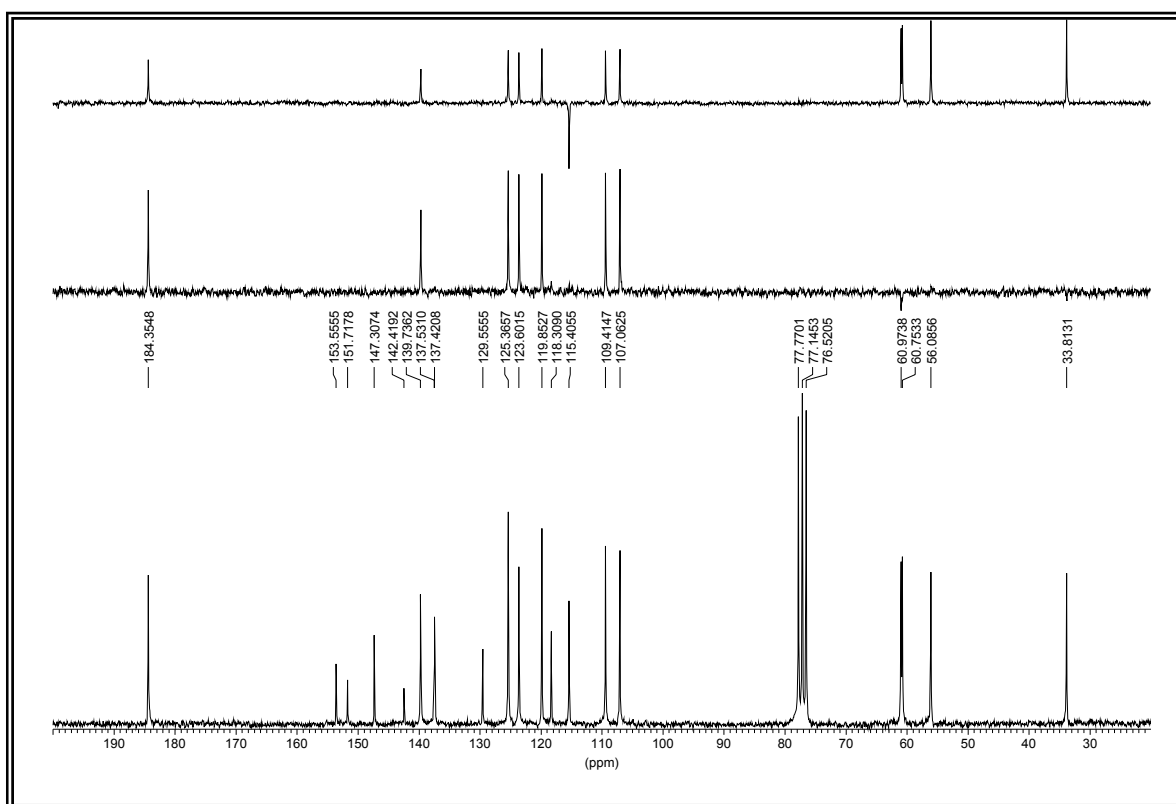


Figura XLIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **60**.

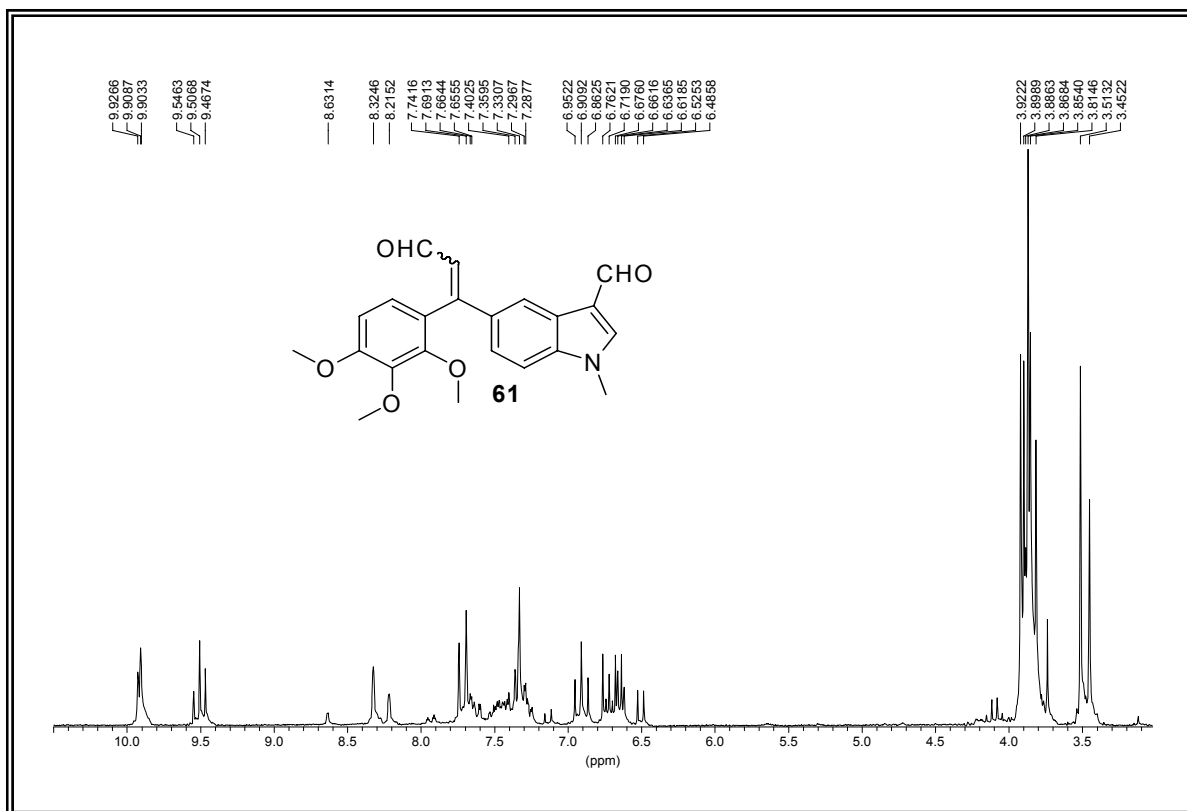


Figura XLIVa. Espectro de RMN ^1H de los compuestos **61Z** y **61E**.

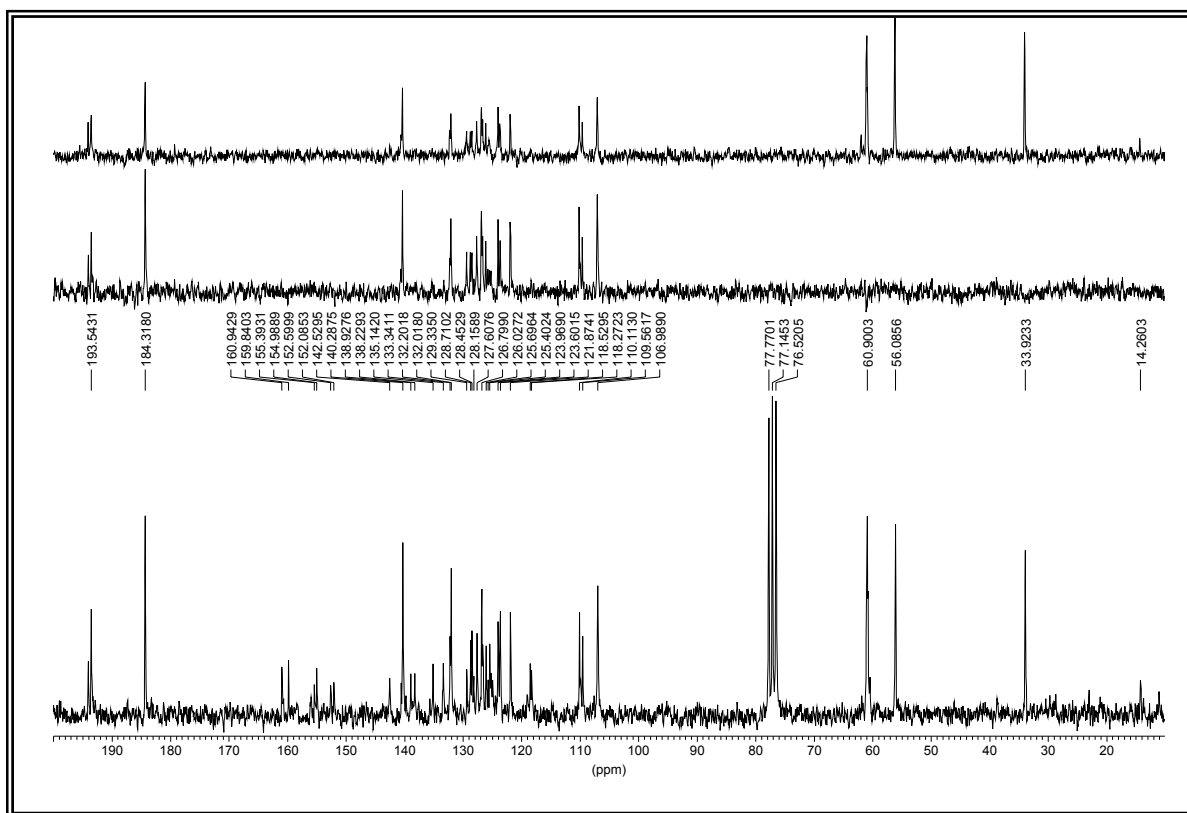


Figura XLIVb. Espectro de RMN ^{13}C de los compuestos **61Z** y **61E**.

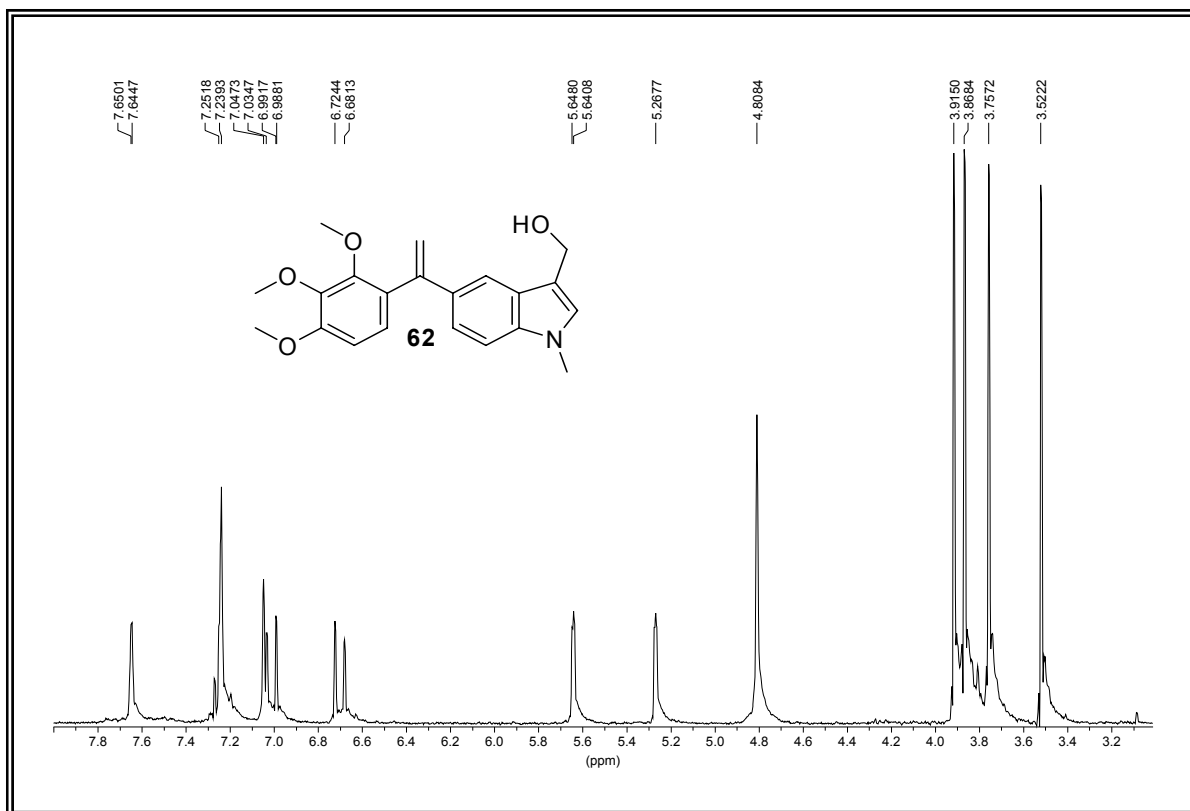


Figura XLVa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **62**.

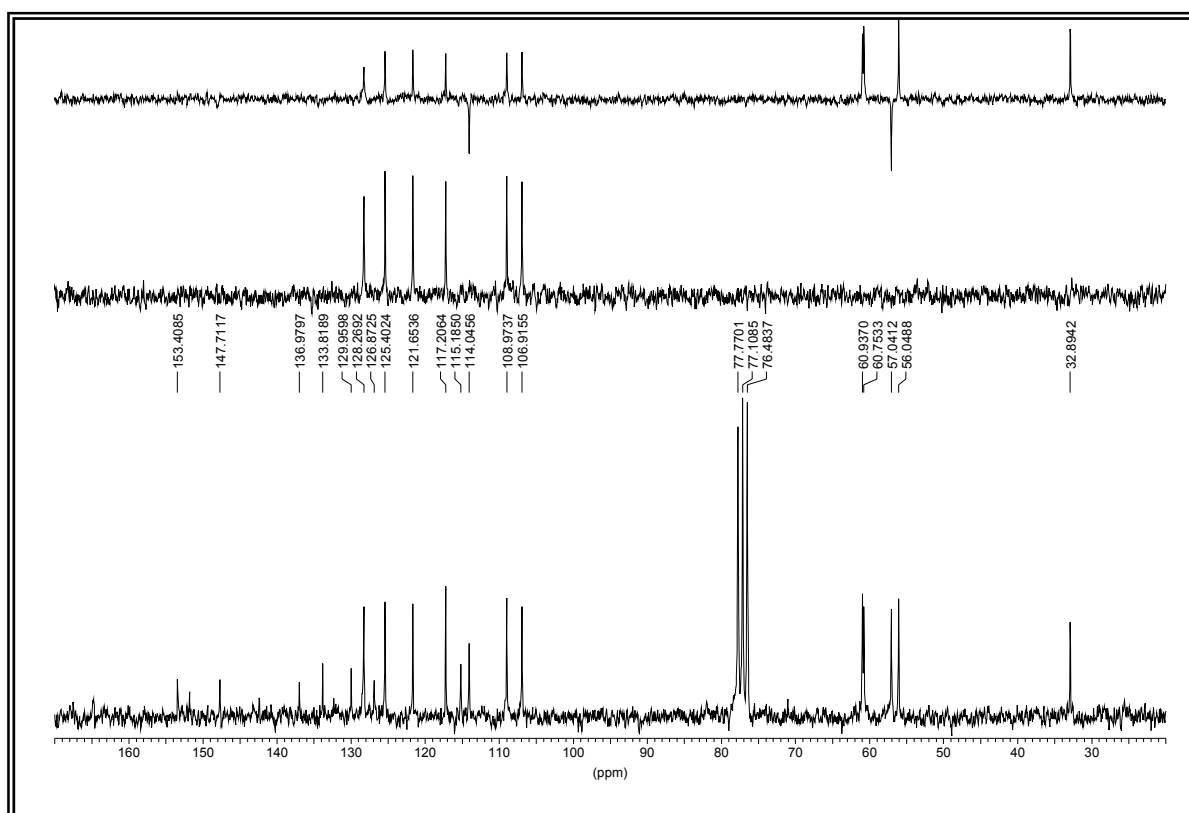


Figura XLVb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **62**.

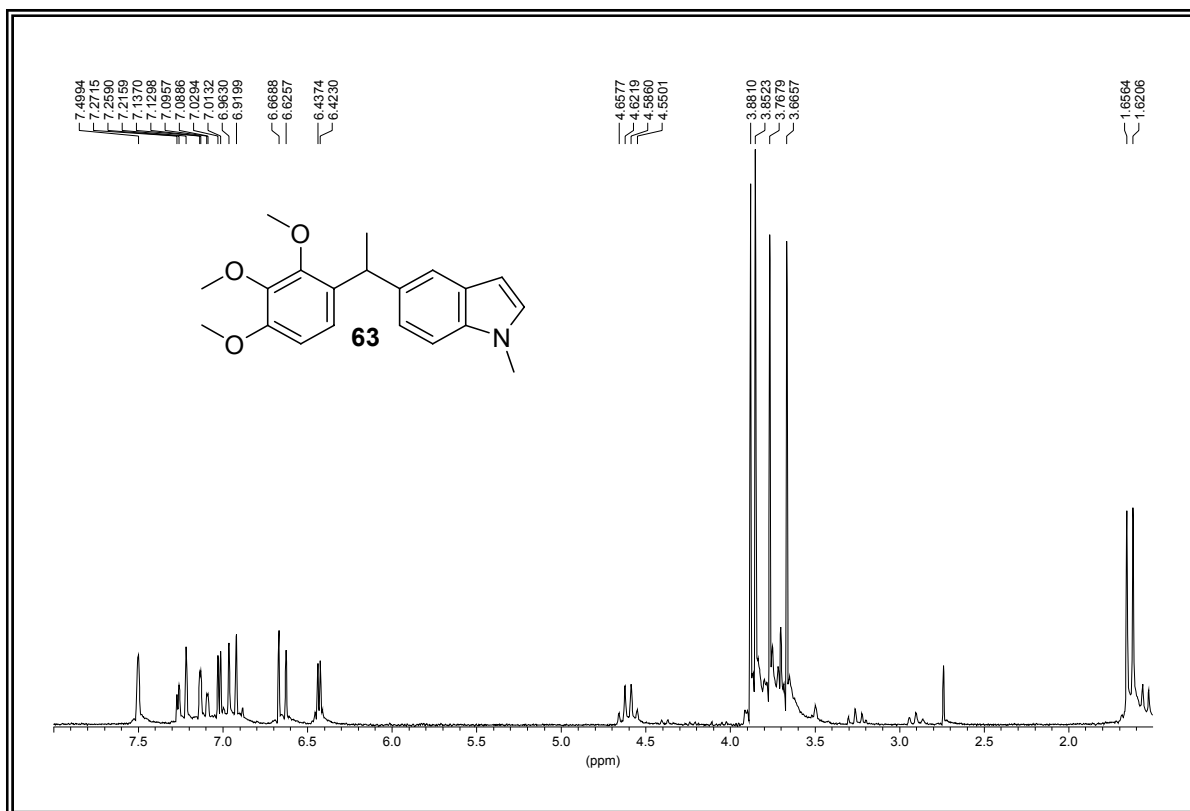


Figura XLVIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **63**.

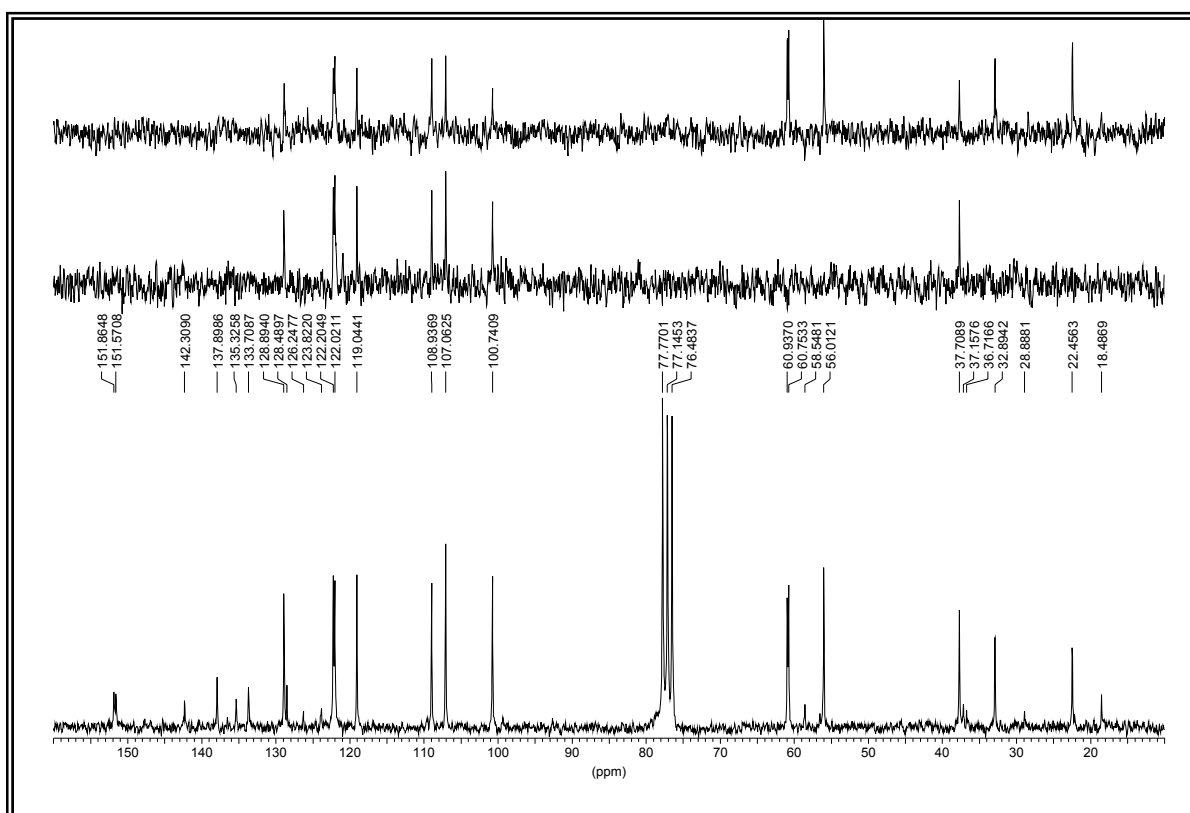


Figura XLVIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **63**.

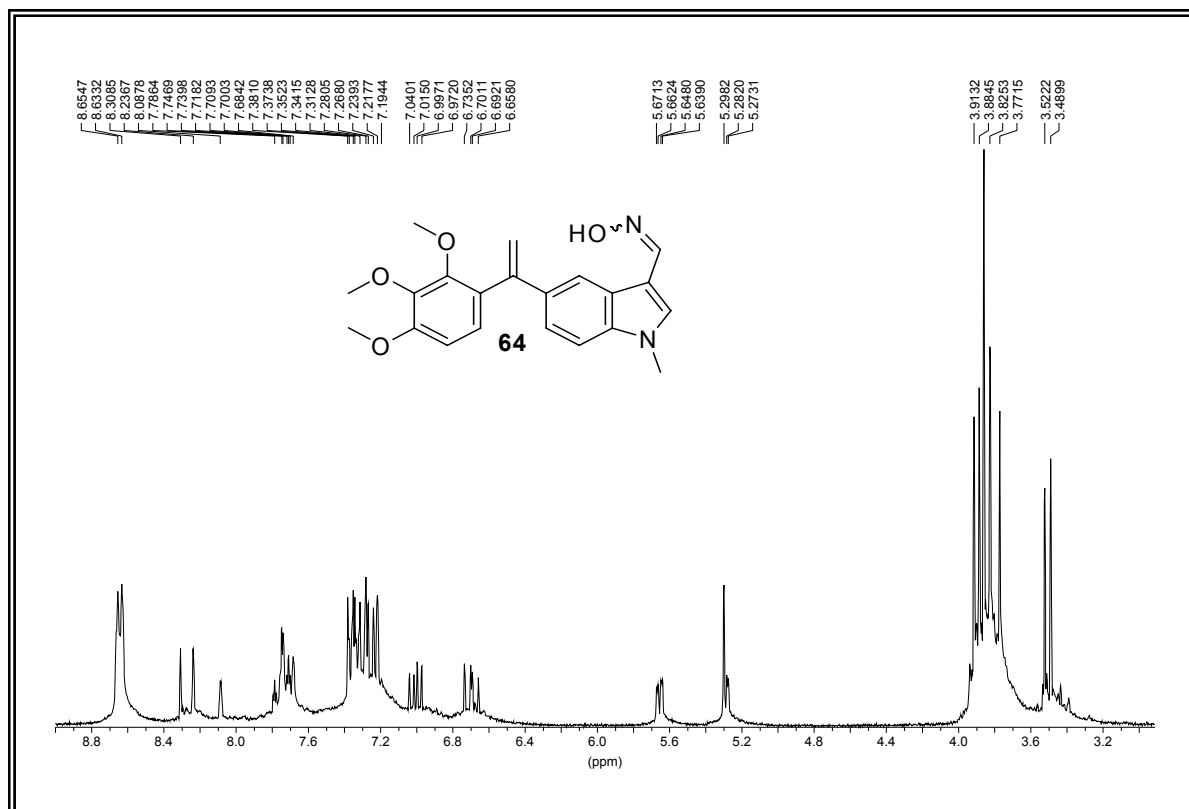


Figura XLVIIa. Espectro de RMN ¹H de los compuestos **64Z** y **64E**.

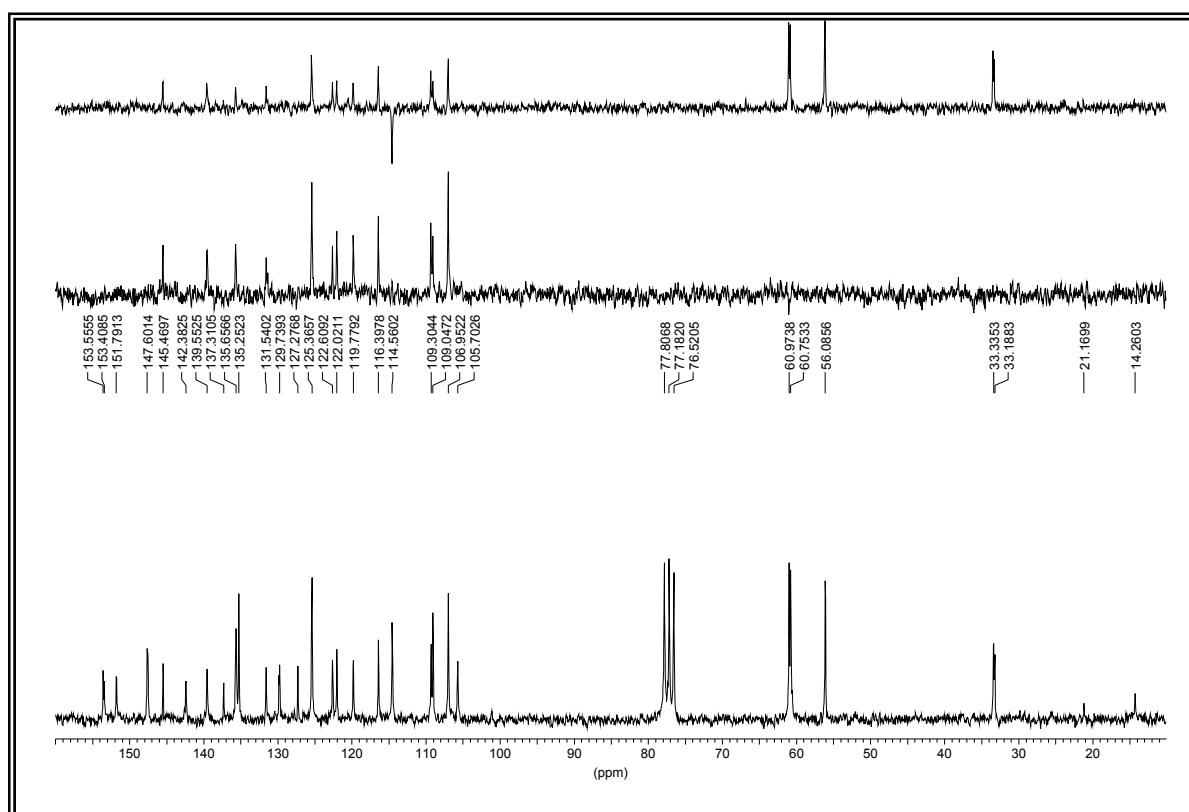


Figura XLVIIb. Espectro de RMN ¹³C de los compuestos **64Z** y **64E**.

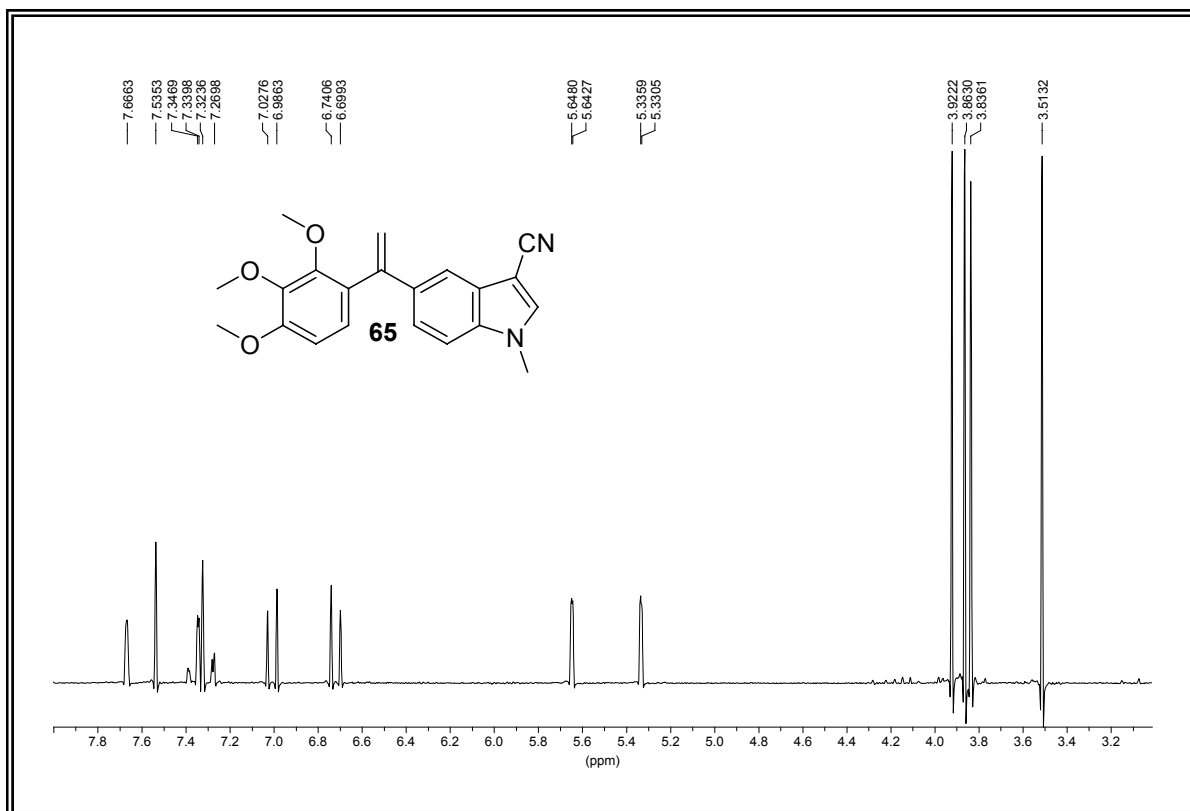


Figura XLVIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **65**.

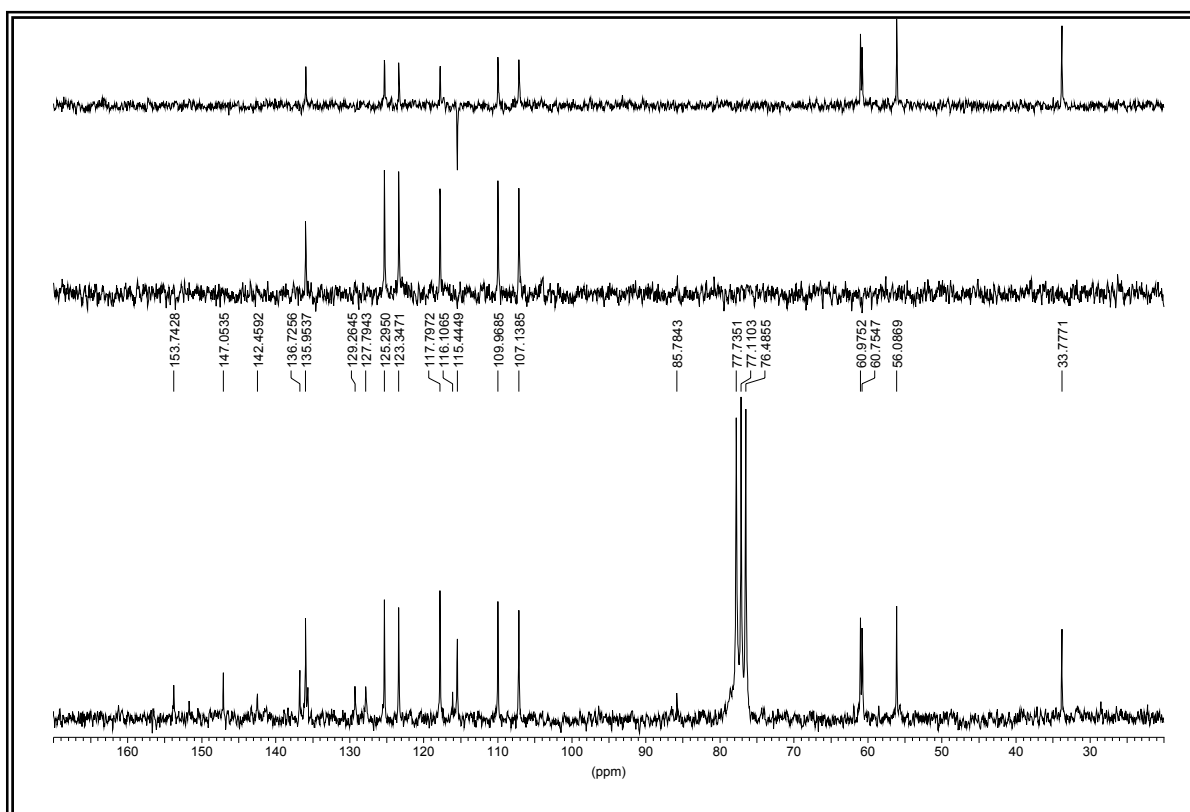


Figura XLVIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **65**.

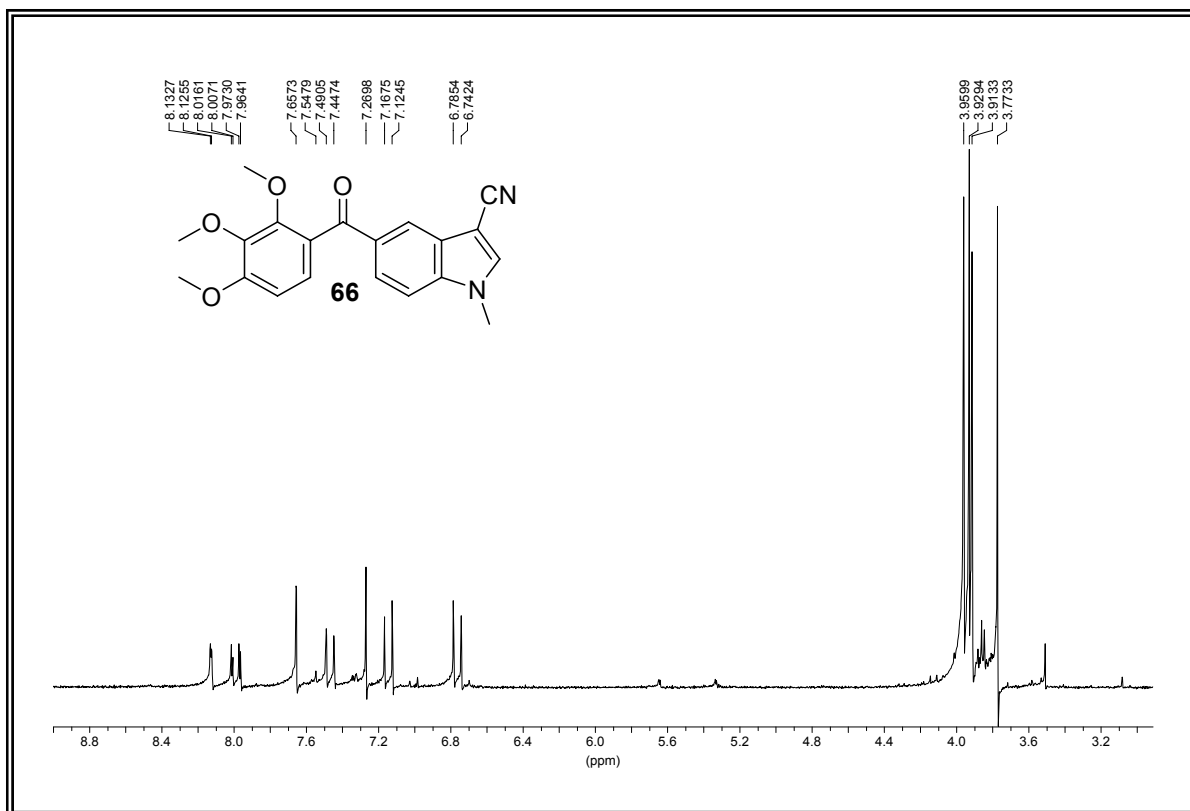


Figura ILa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **66**.

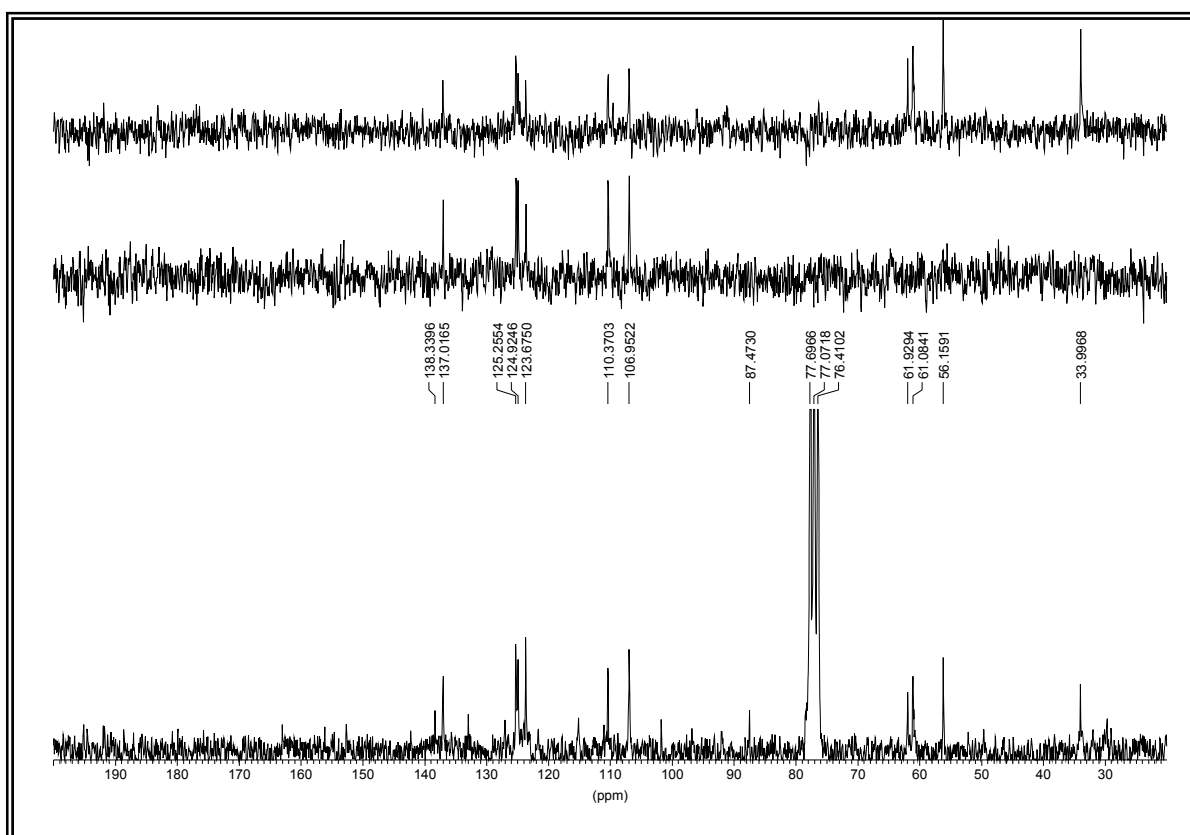
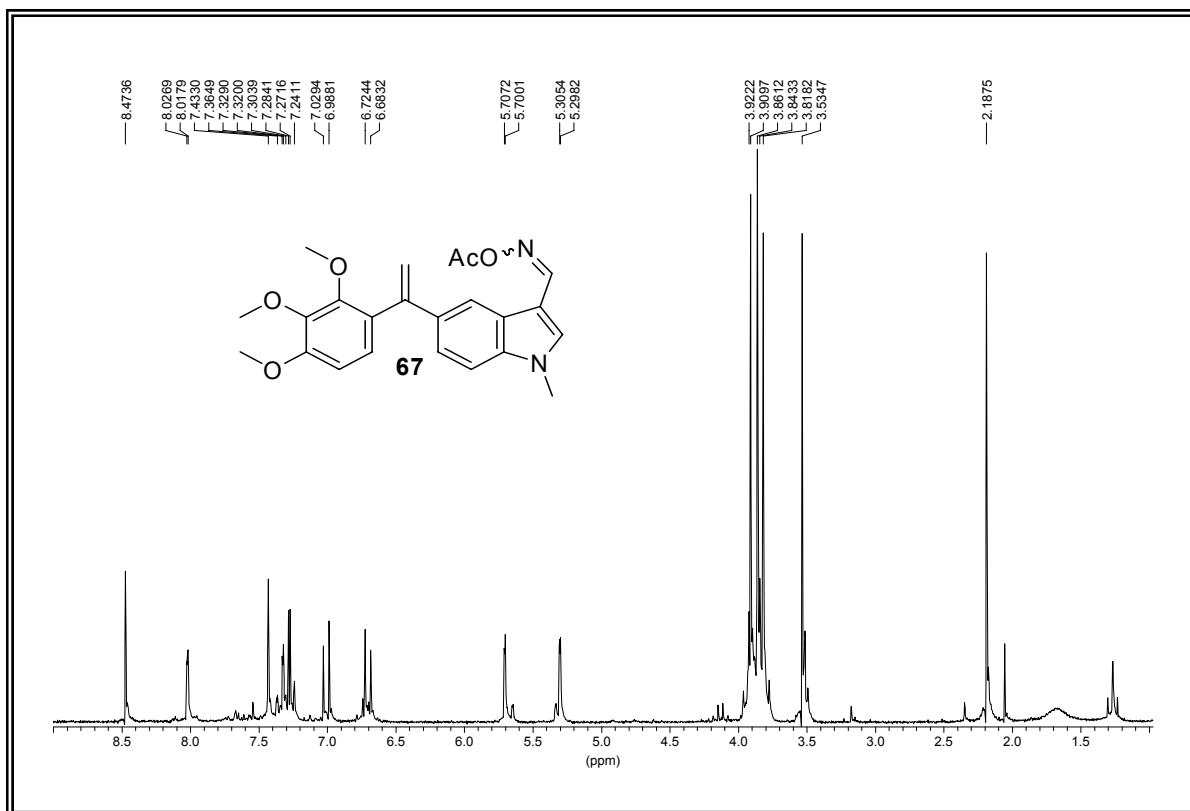


Figura ILb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **66**.

Figura L. Espectro de RMN ^1H del compuesto **67**.

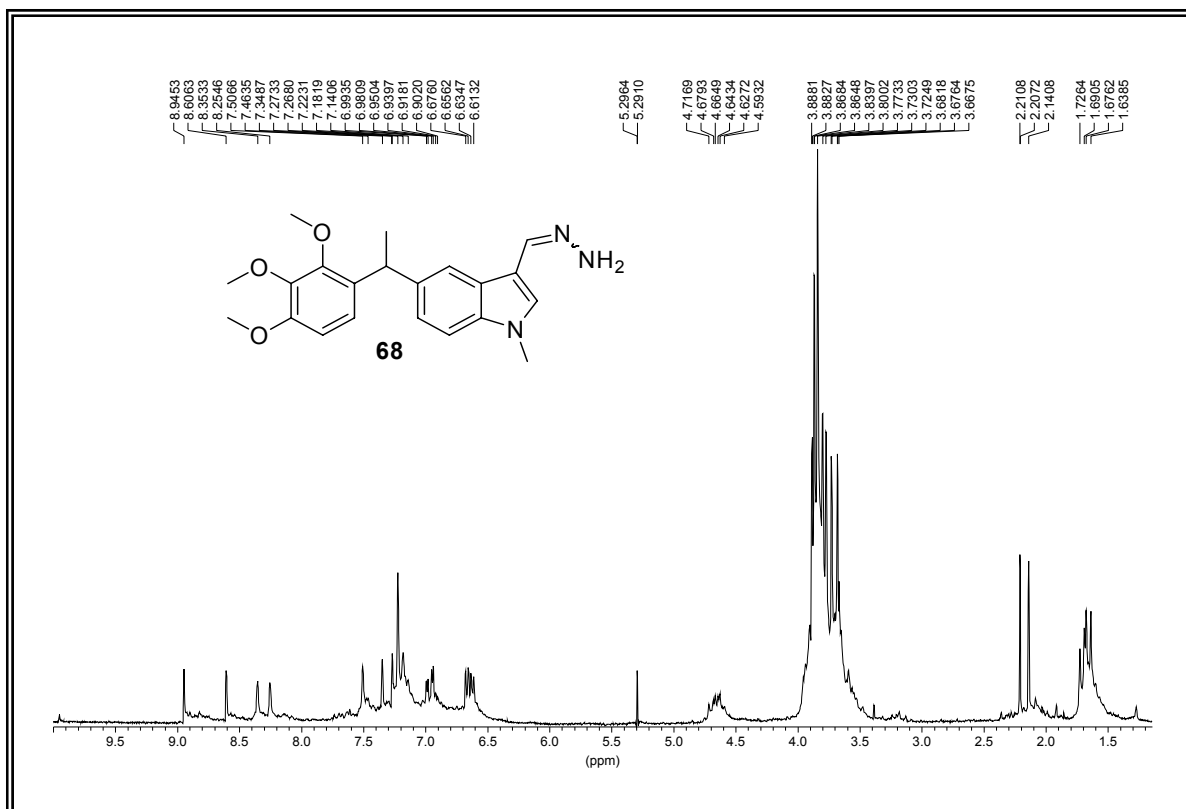


Figura LIa. Espectro de RMN ^1H de los compuestos **68Z** y **68E**.

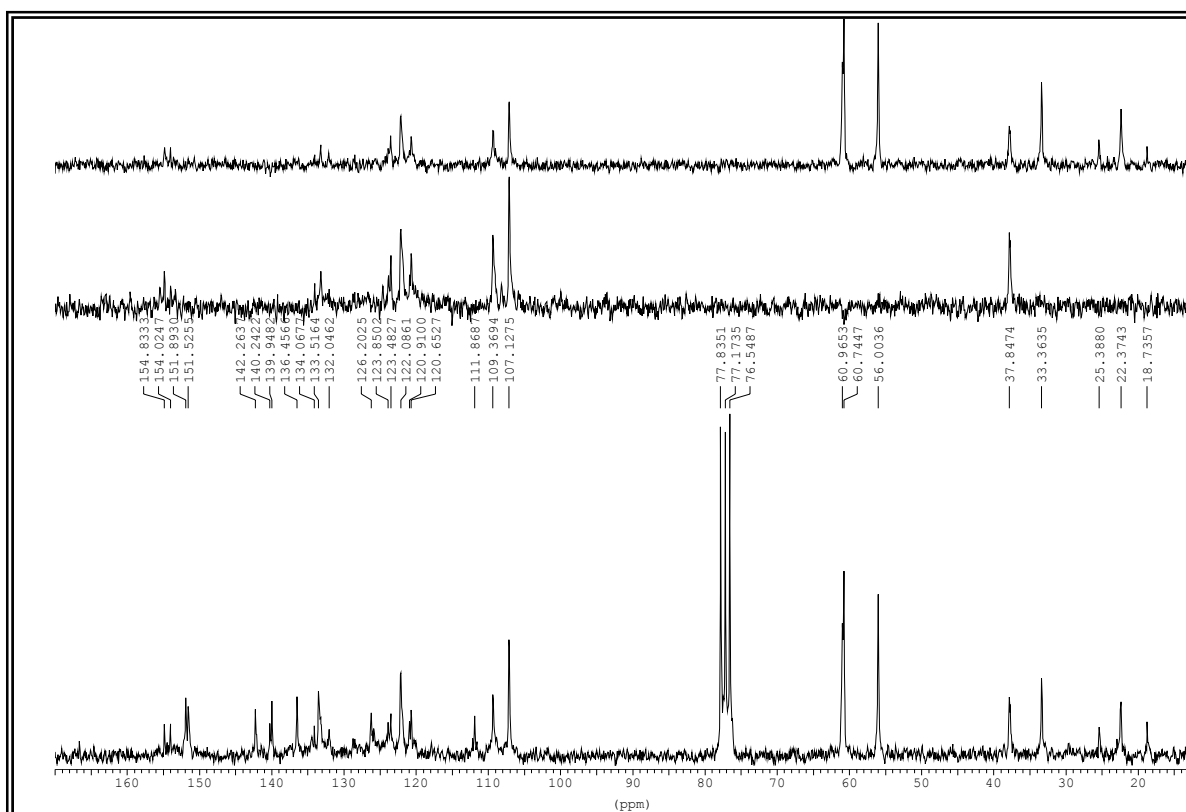


Figura LIb. Espectro de RMN ^{13}C de los compuestos **68Z** y **68E**.

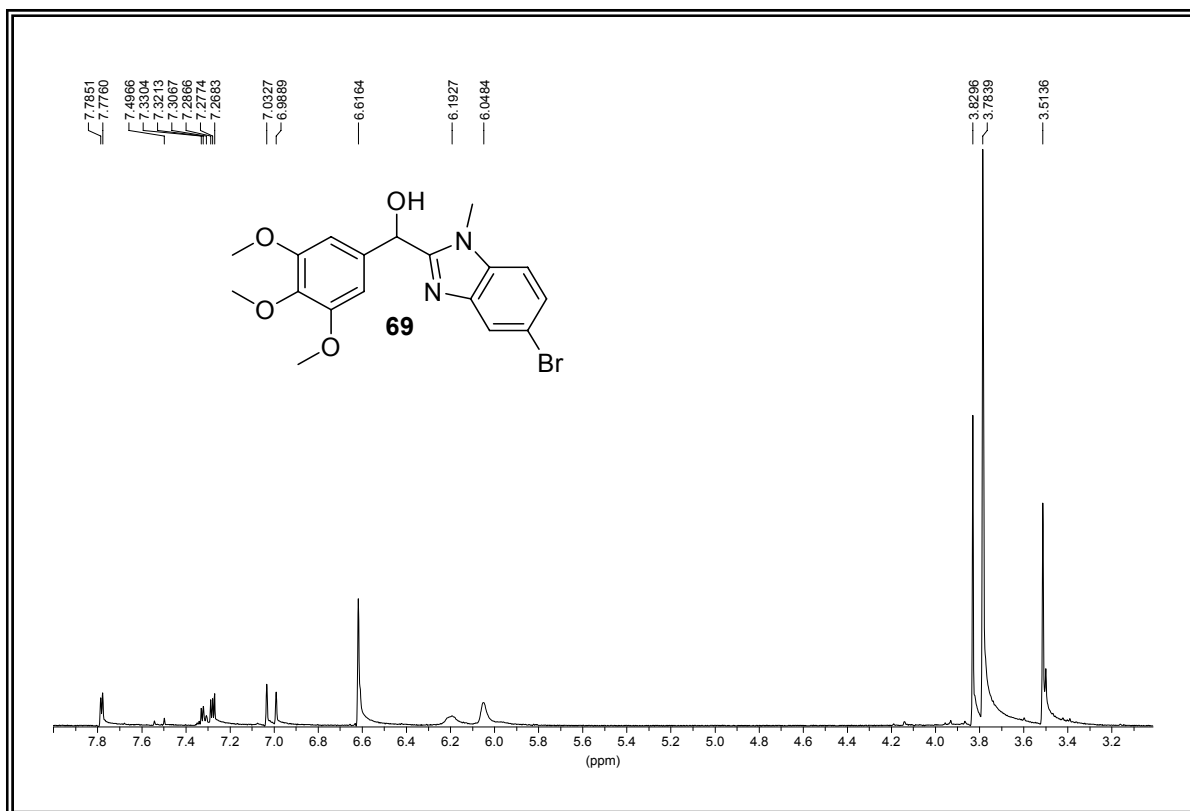


Figura LIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **69**.

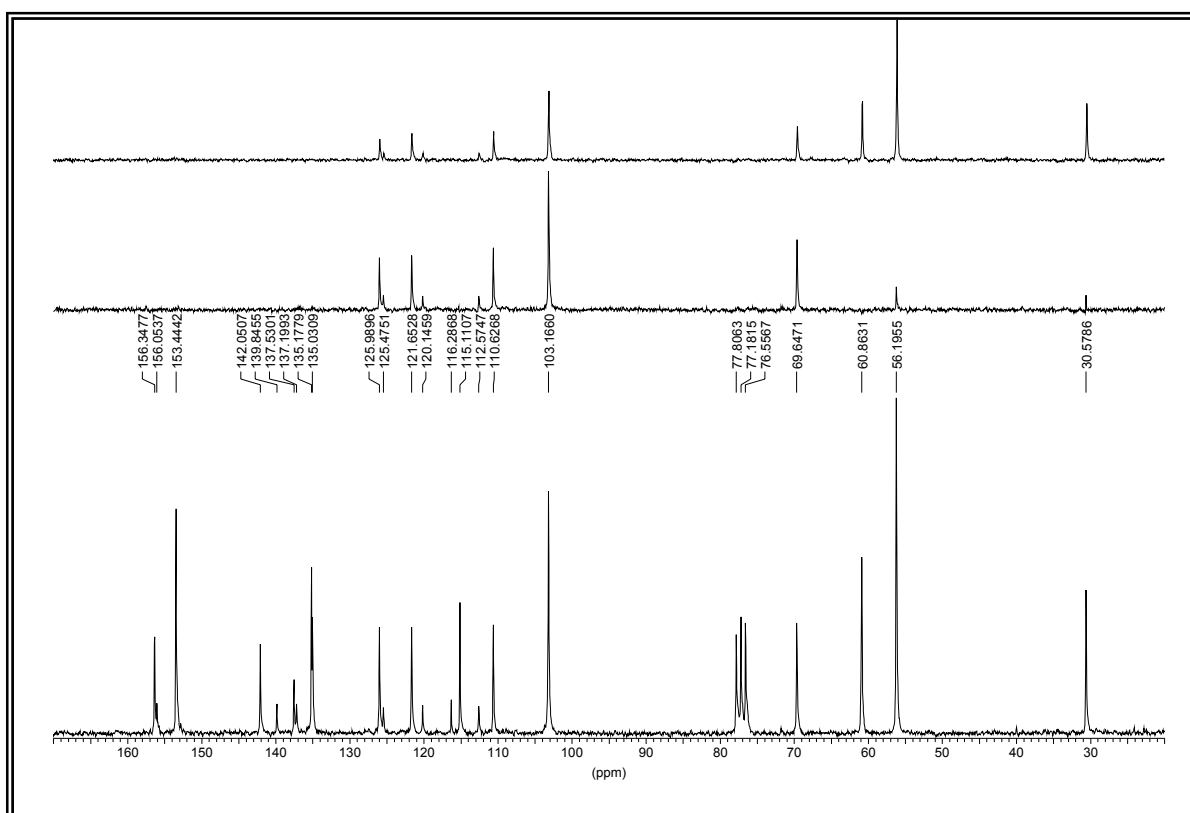


Figura LIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **69**.

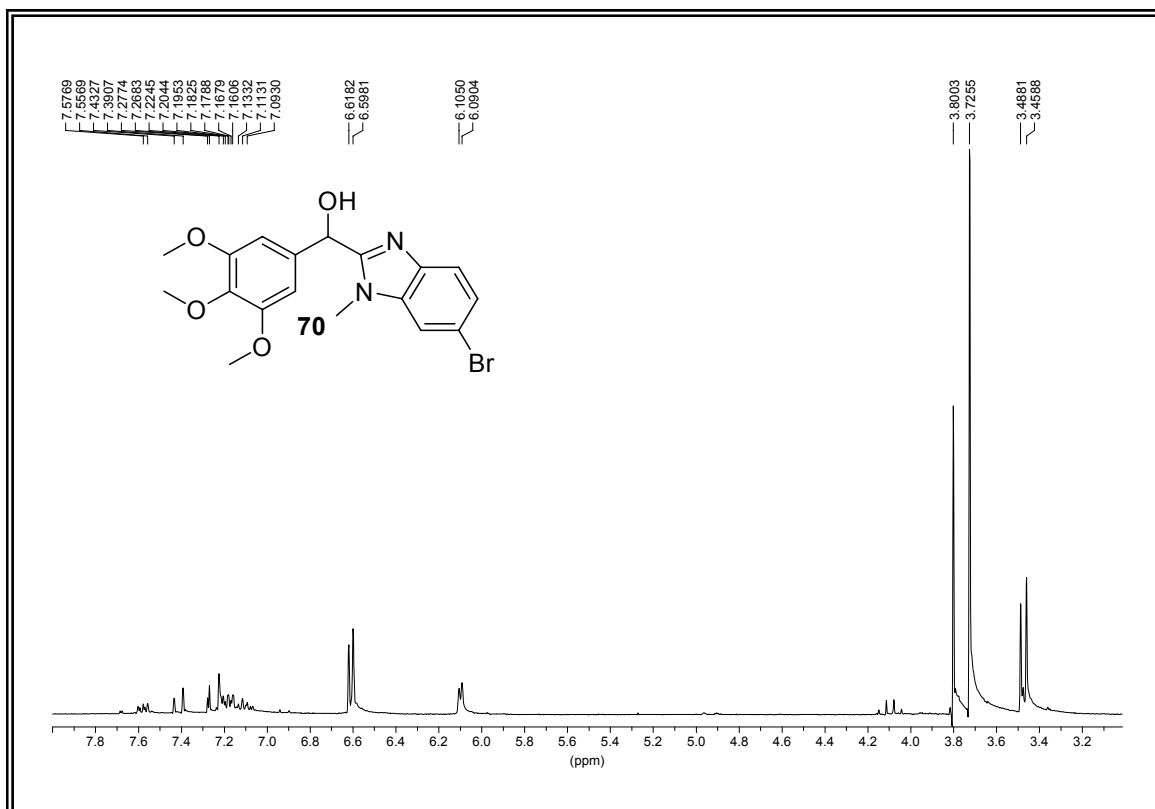


Figura LIII. Espectro de RMN ^1H del compuesto **70**.

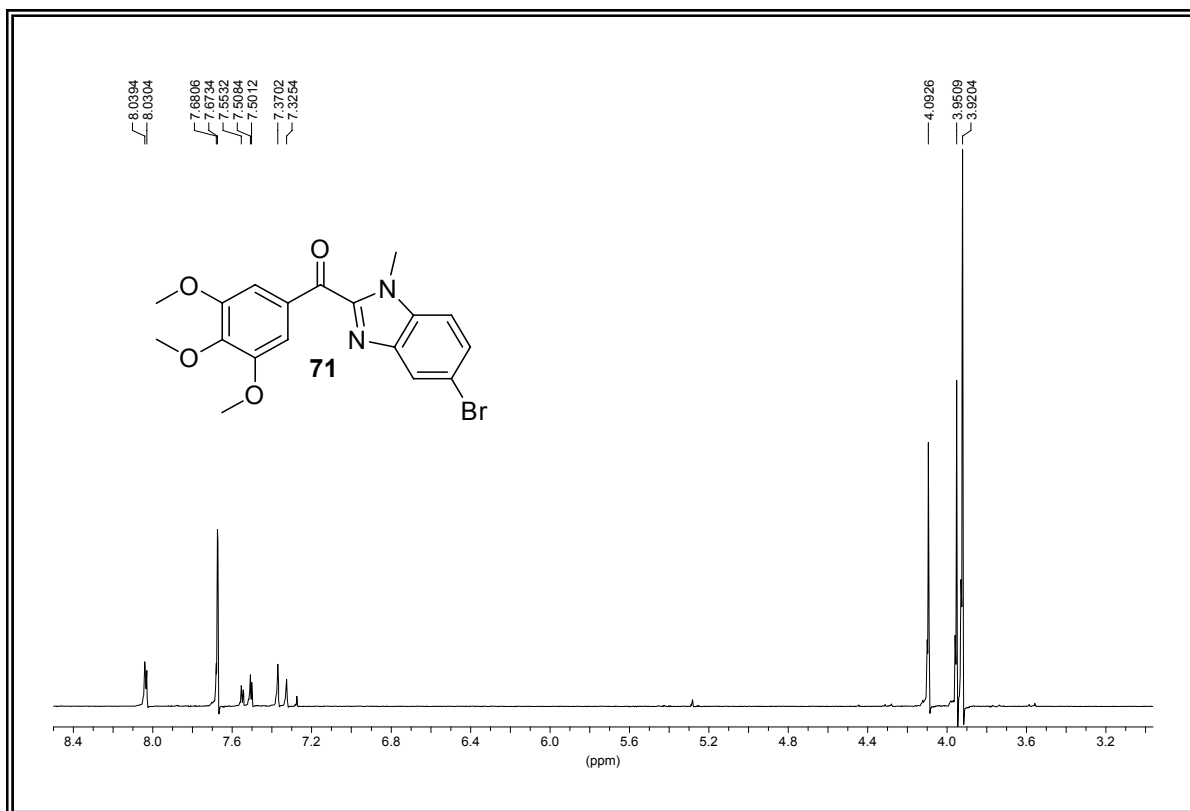


Figura LIVa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **71**.

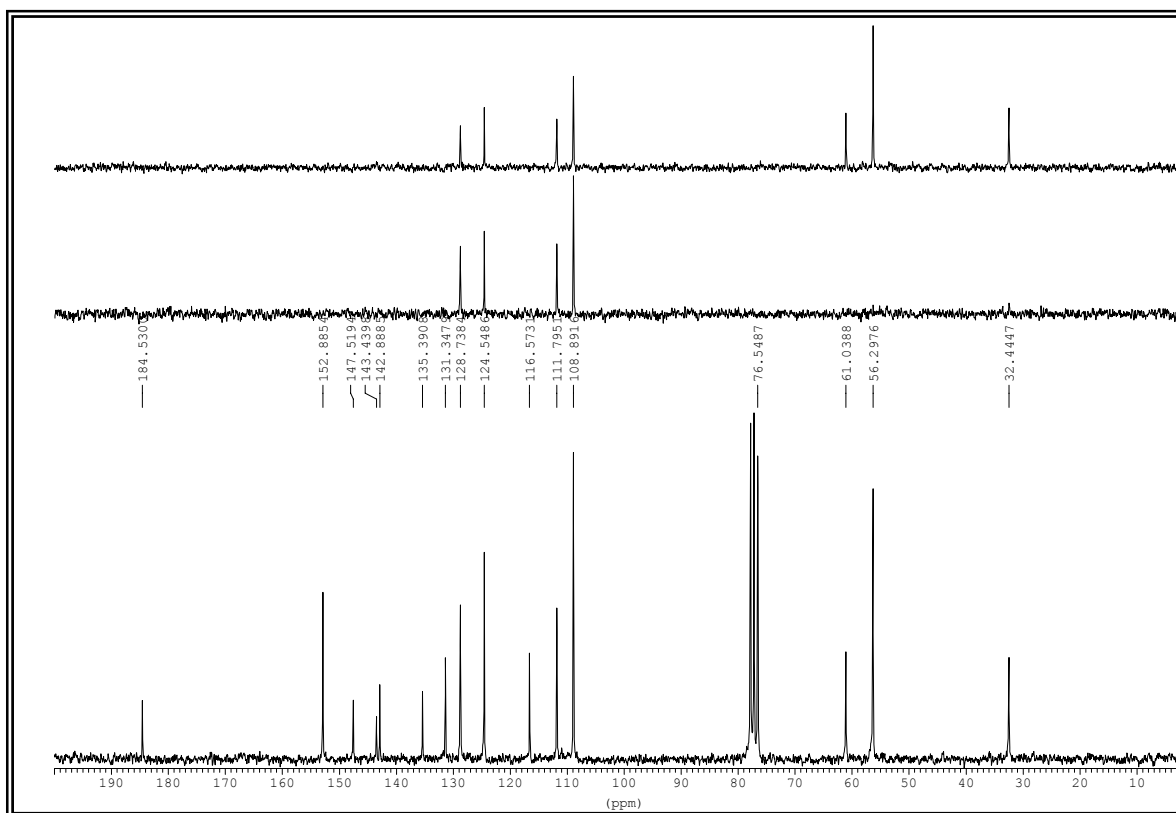


Figura LIVb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **71**.

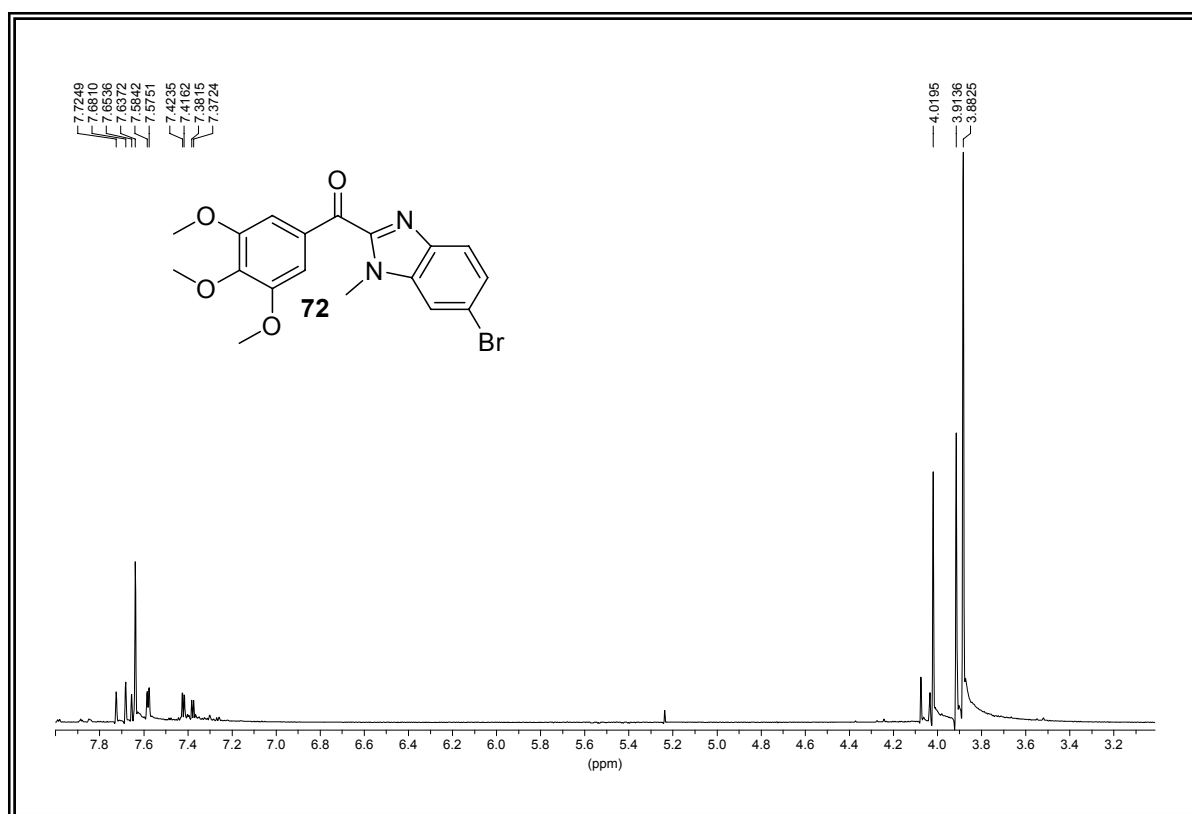


Figura LVa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **72**.

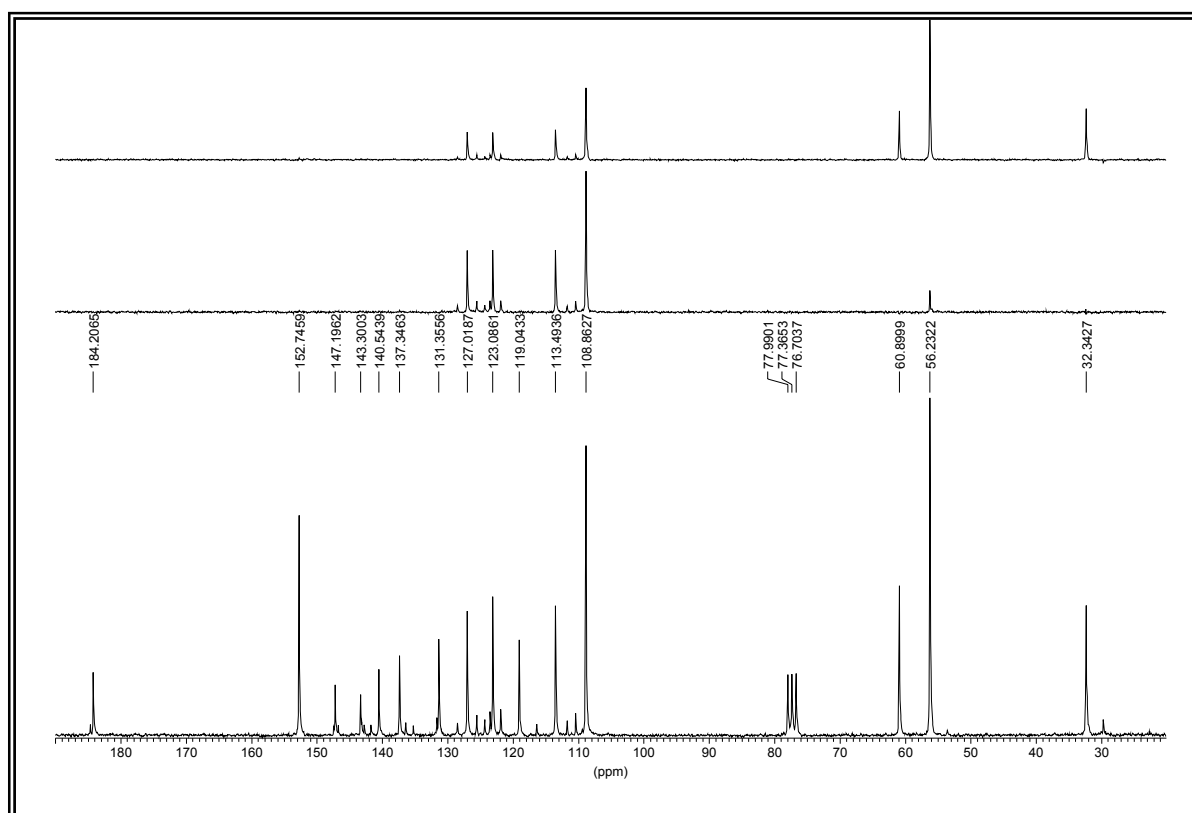
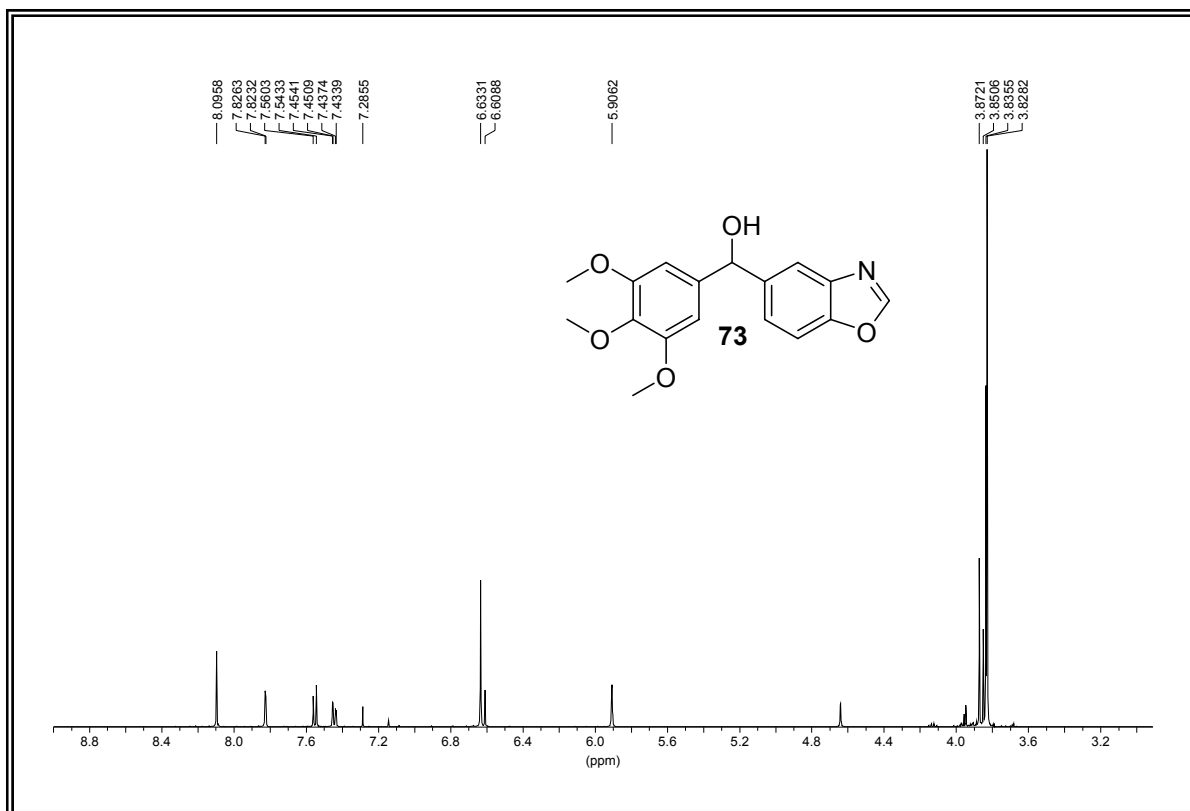
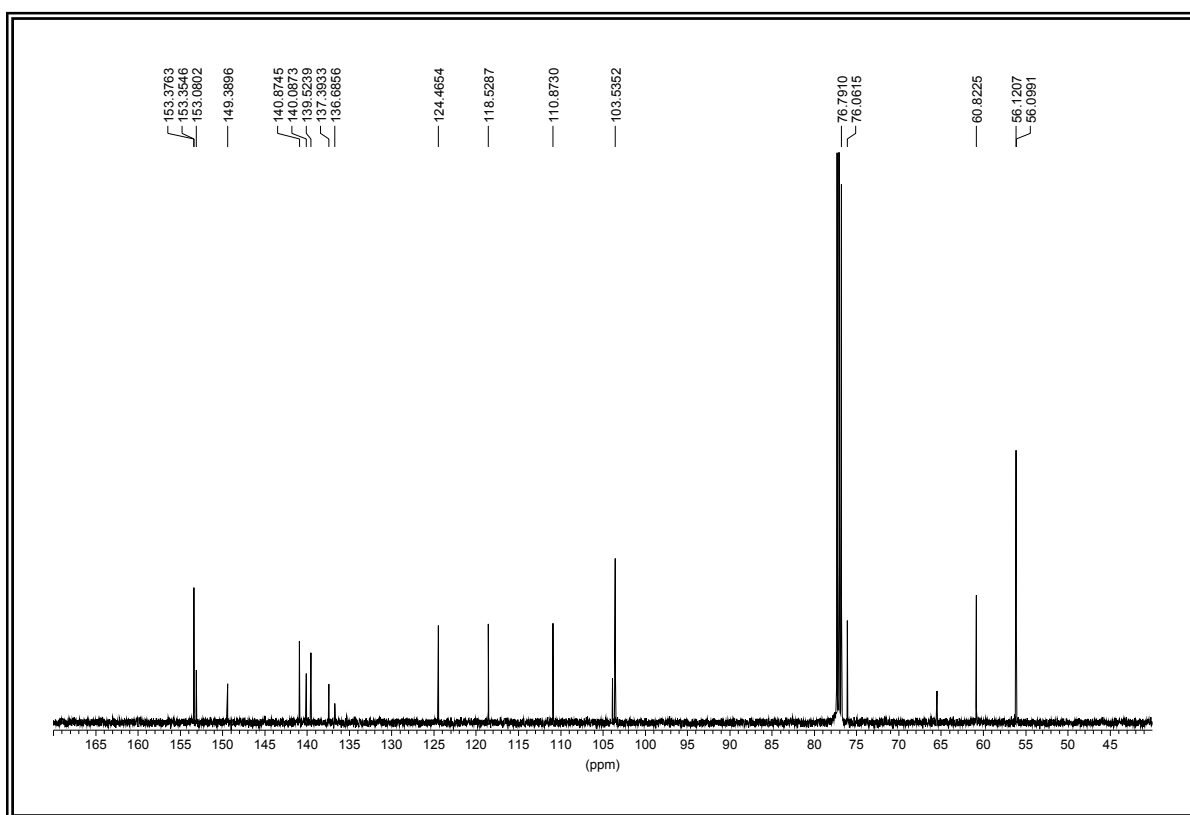


Figura LVb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **72**.

Figura LVia. Espectro de RMN ^1H del compuesto **73**.Figura LVib. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **73**.

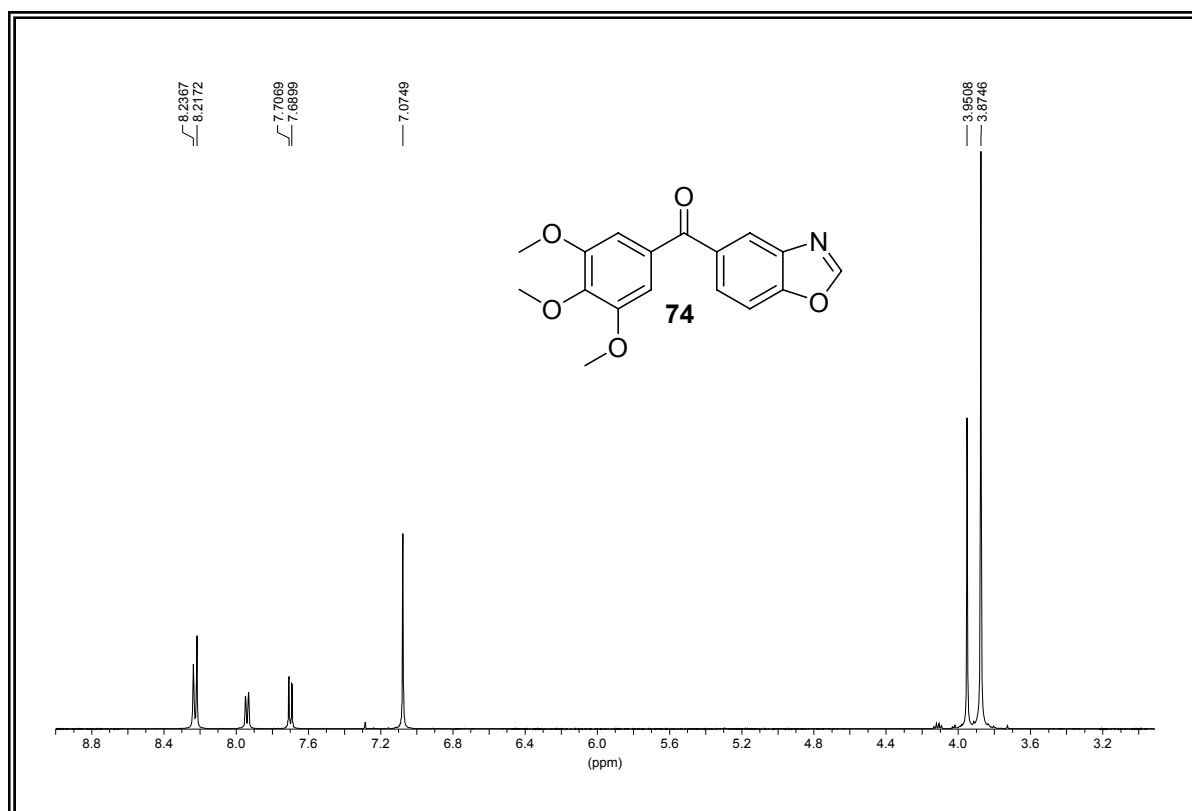


Figura LVIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto 74.

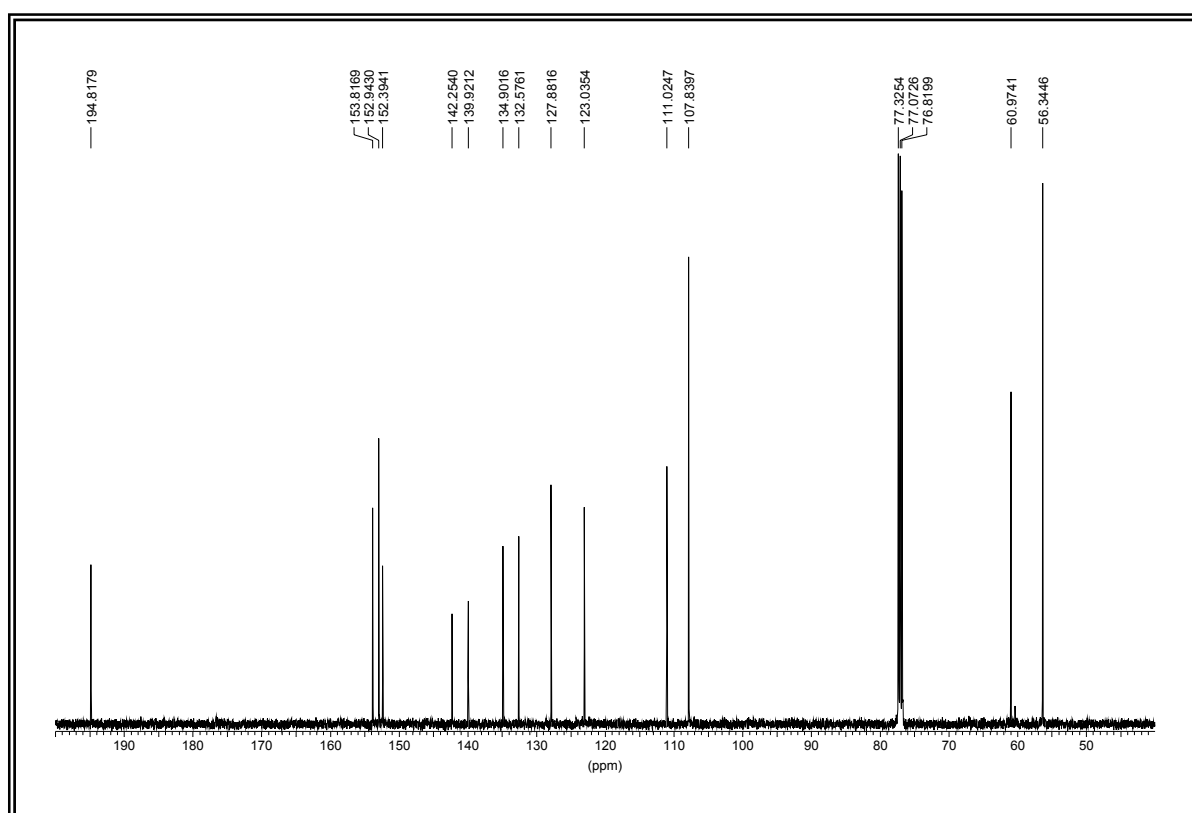


Figura LVIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 74.

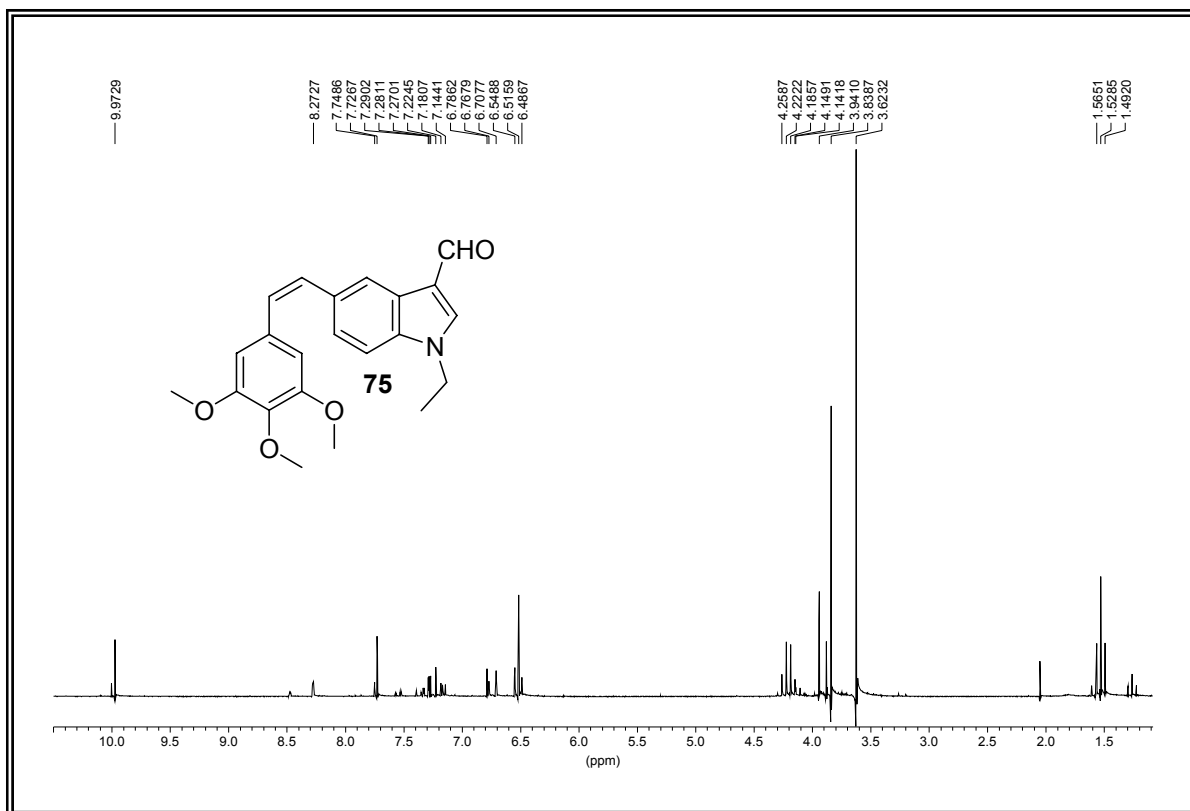


Figura LVIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **75**.

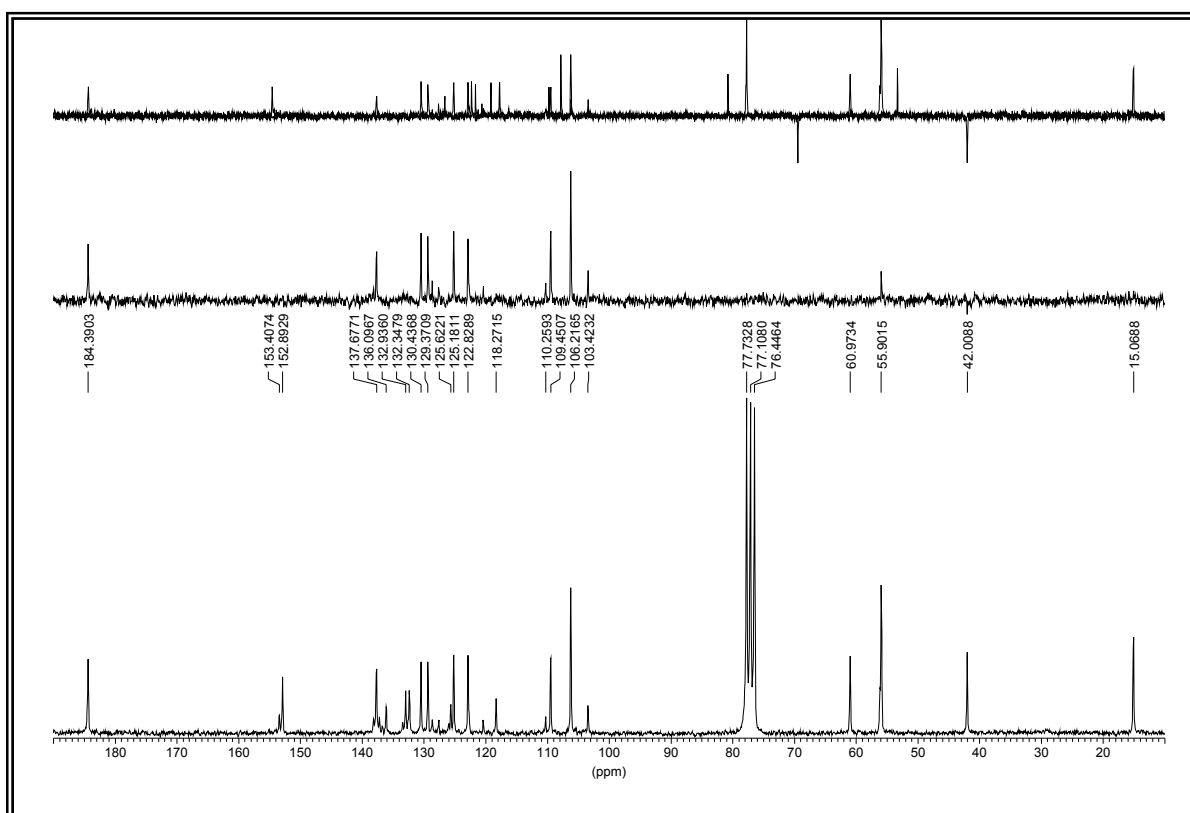


Figura LVIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **75**.

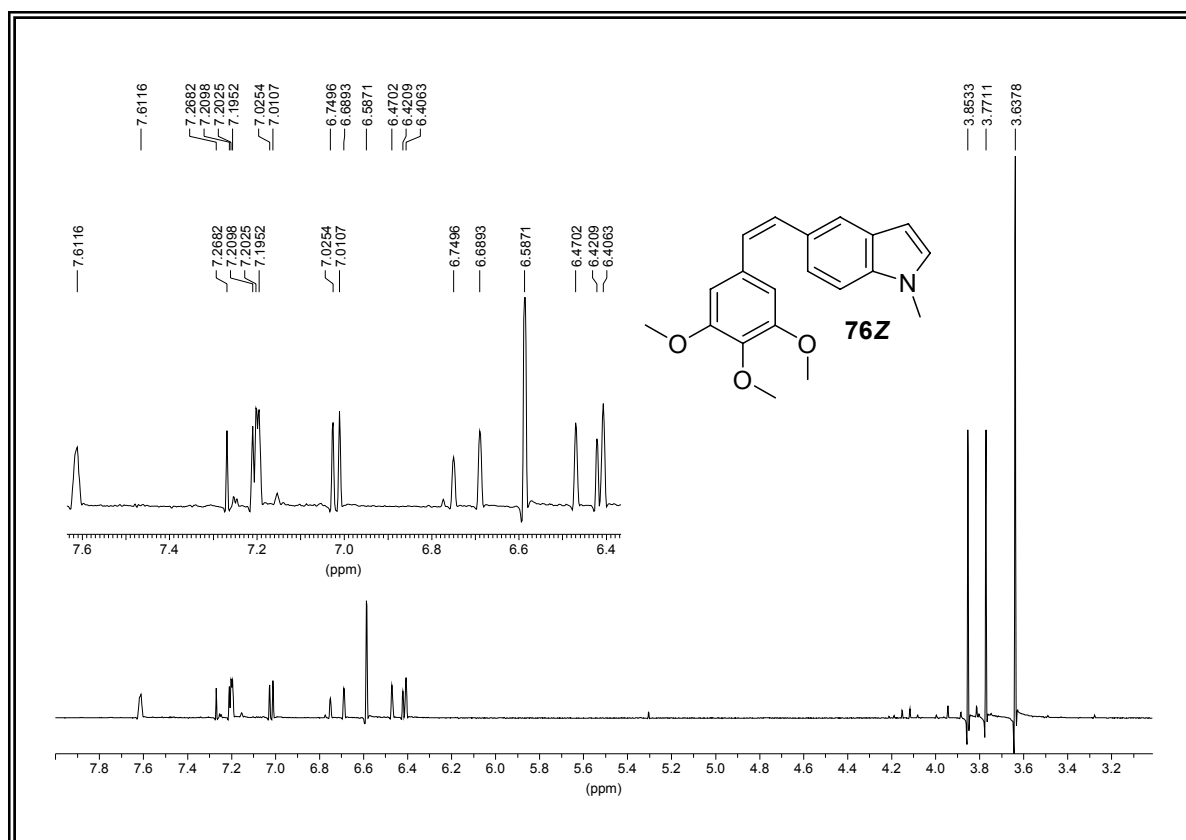


Figura LIXa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **76Z**.

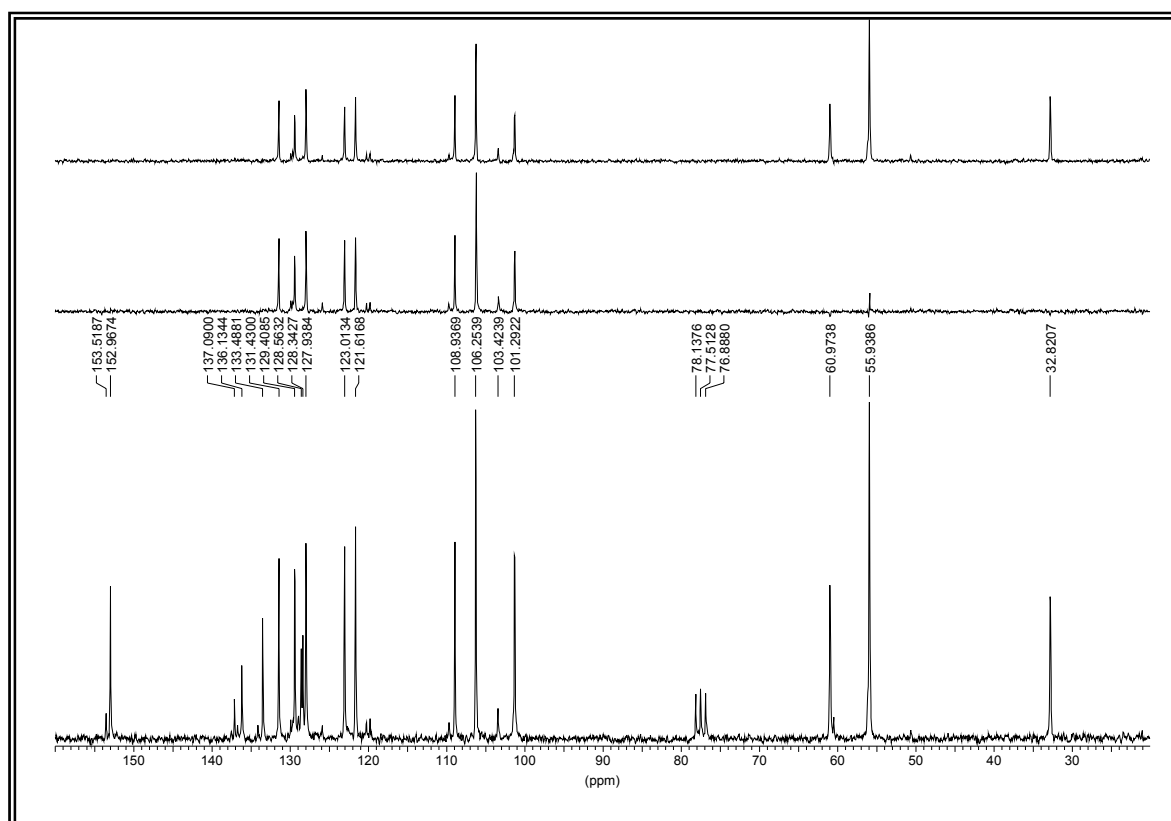


Figura LIXb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **76Z**.

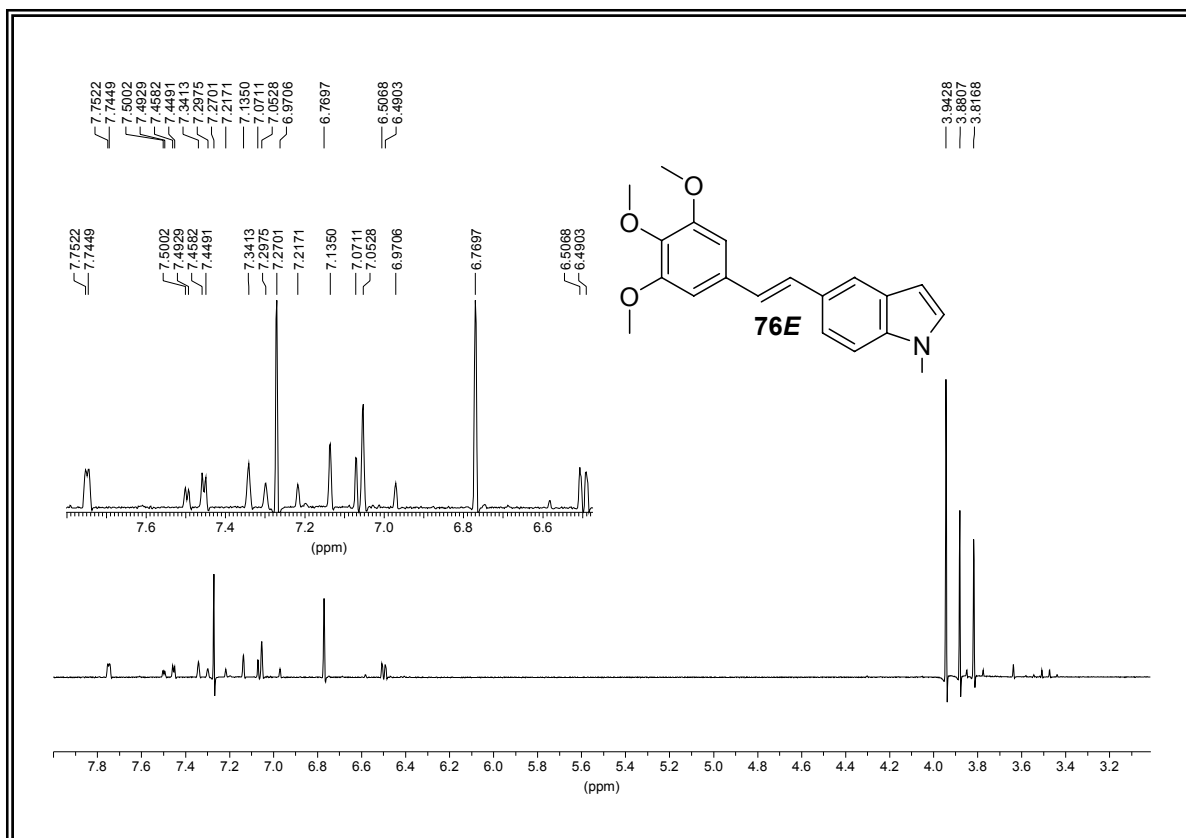


Figura LIXc. Espectro de RMN ¹H del compuesto **76E**.

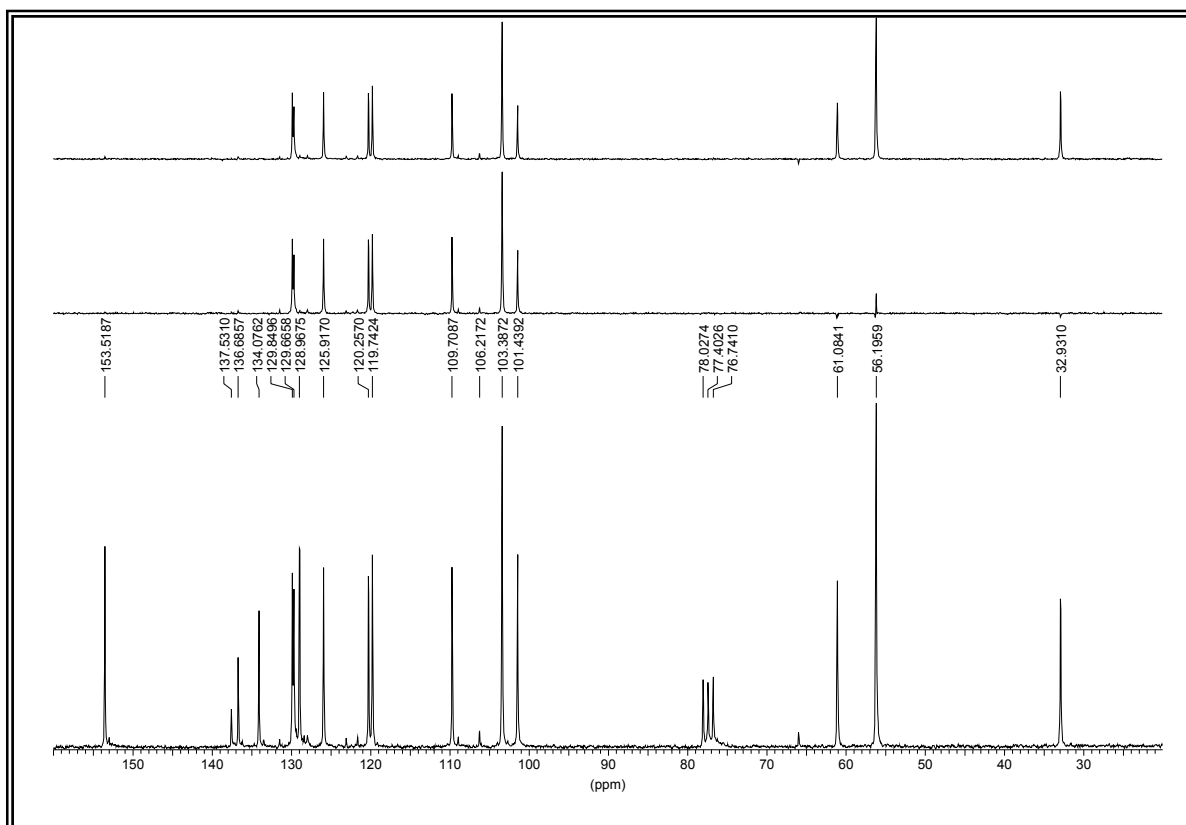


Figura LIXd. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **76E**.

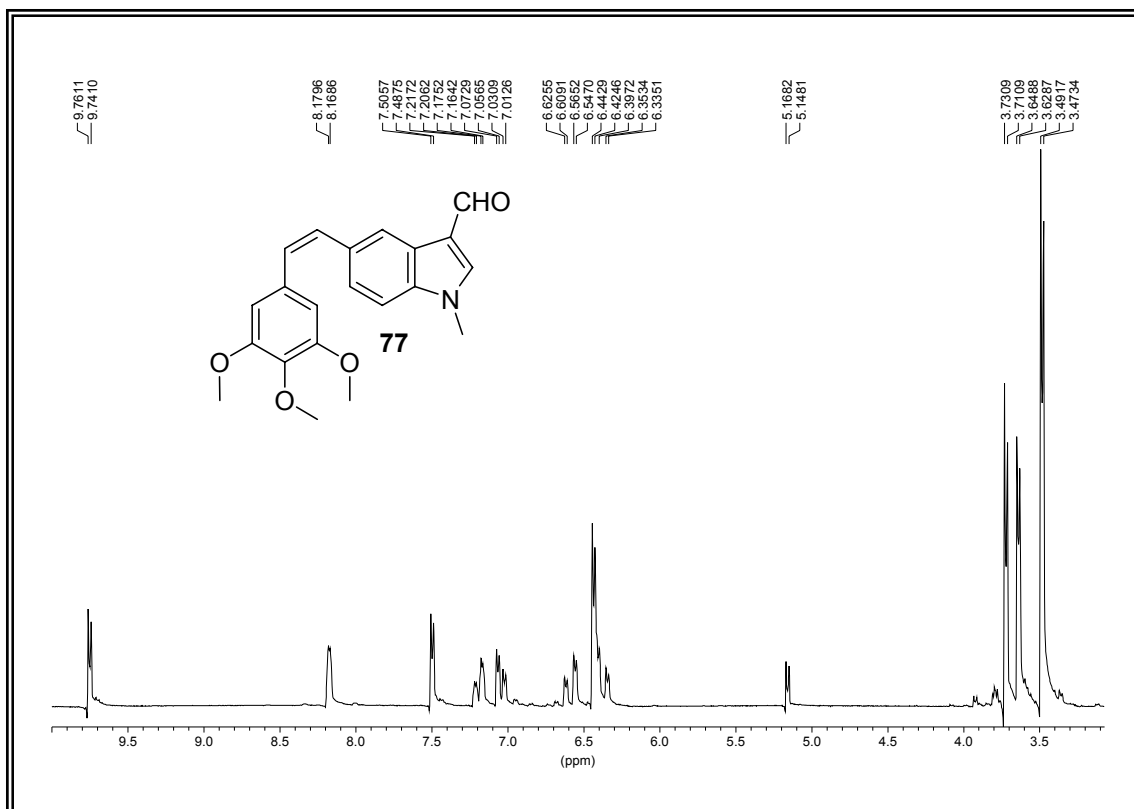


Figura LXa. Espectro de RMN ¹H del compuesto 77.

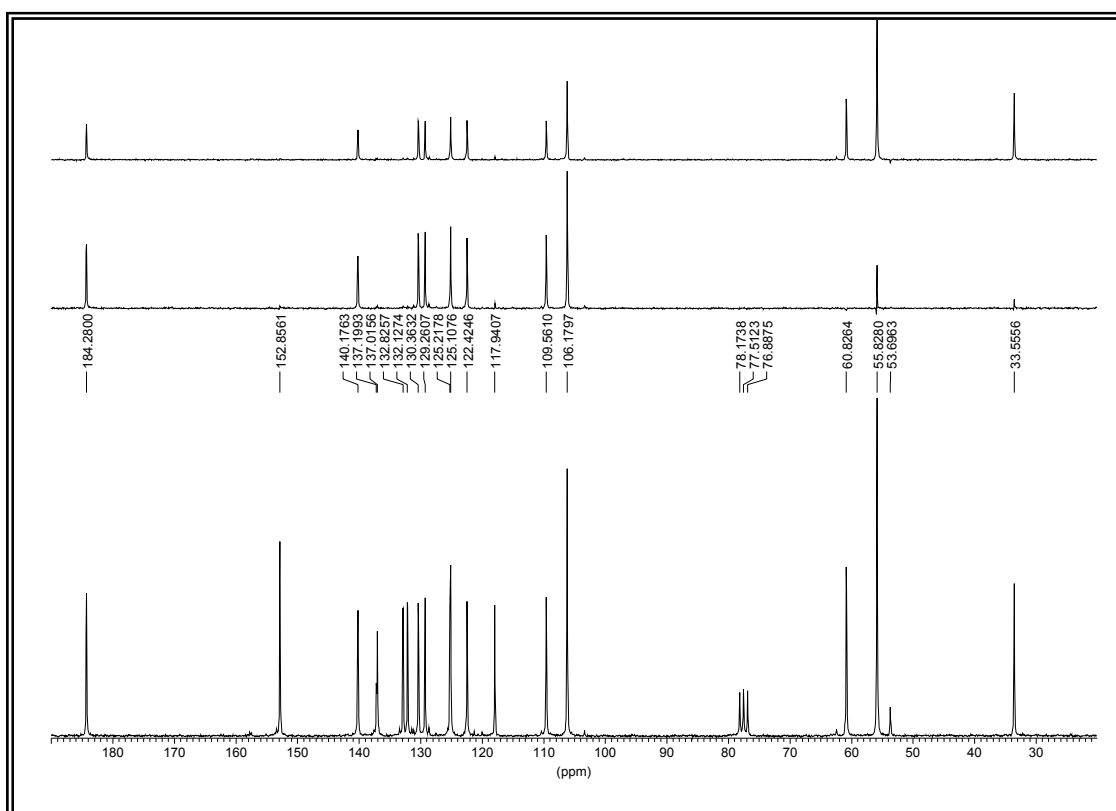


Figura LXb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto 77.

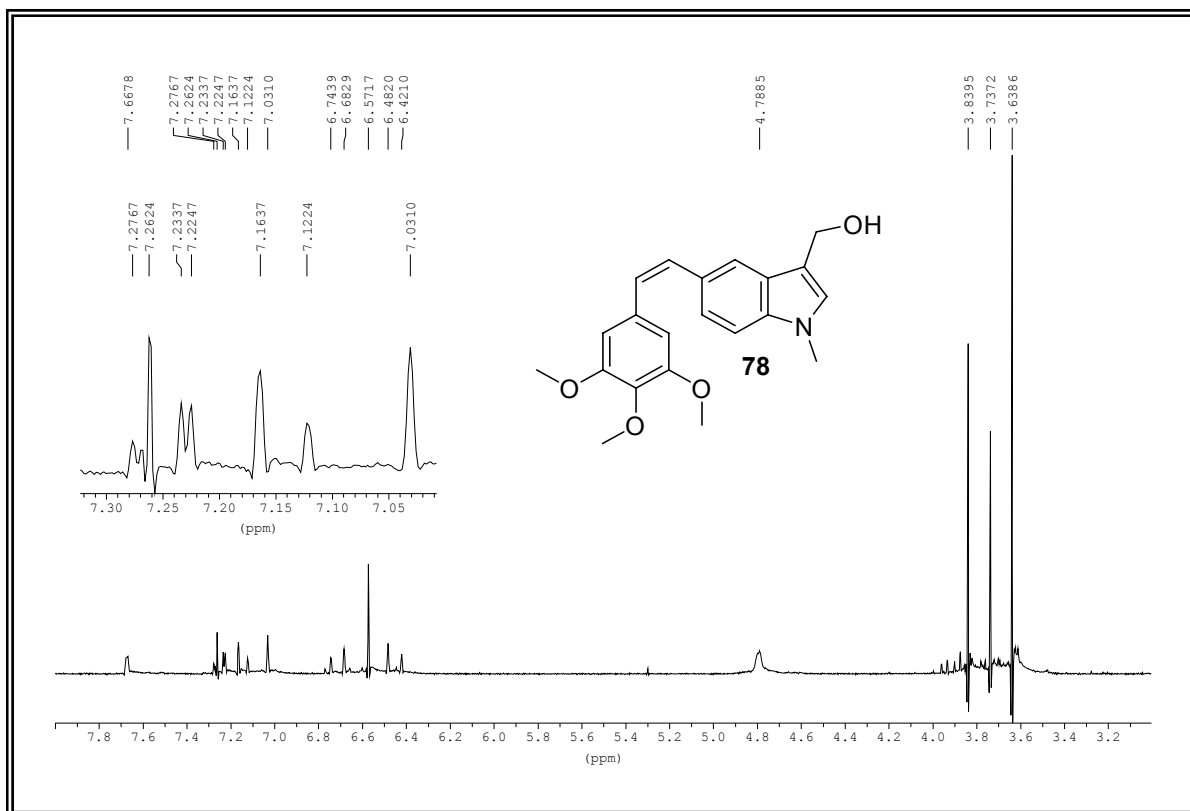


Figura LXIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **78**.

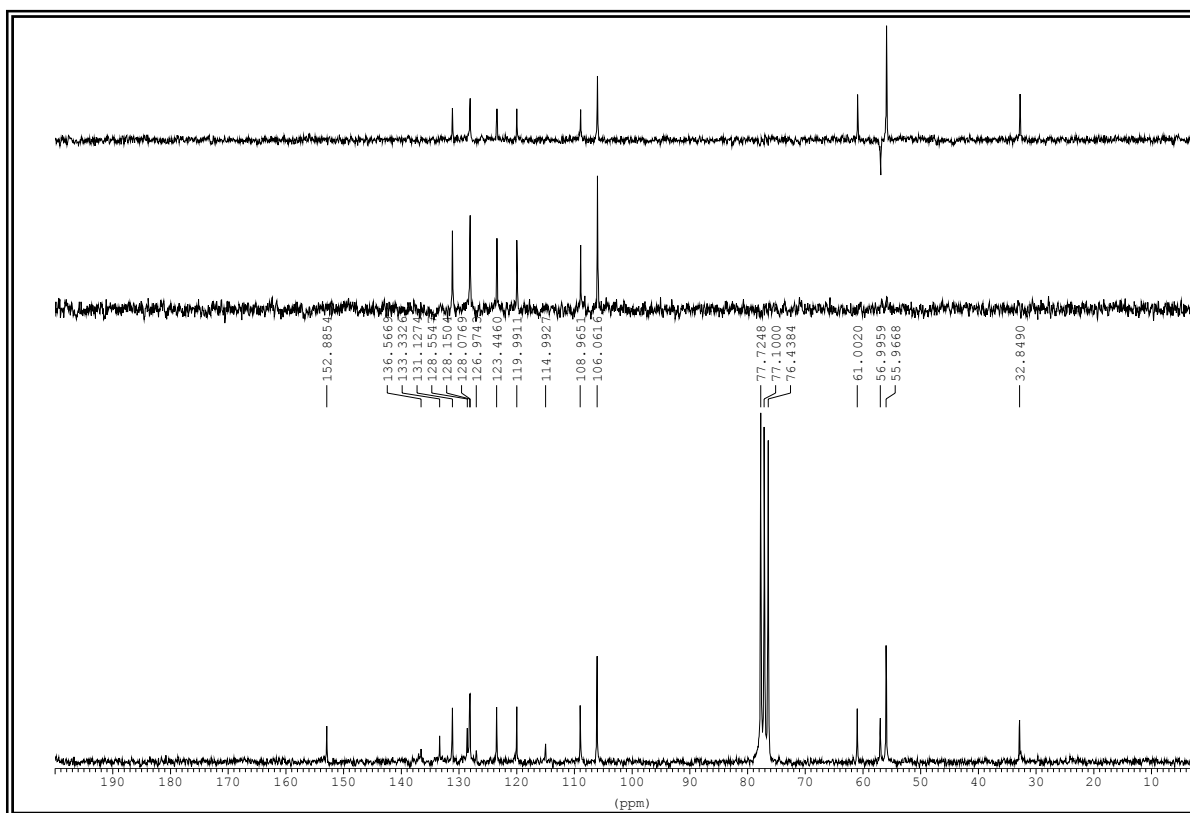


Figura LXIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **78**.

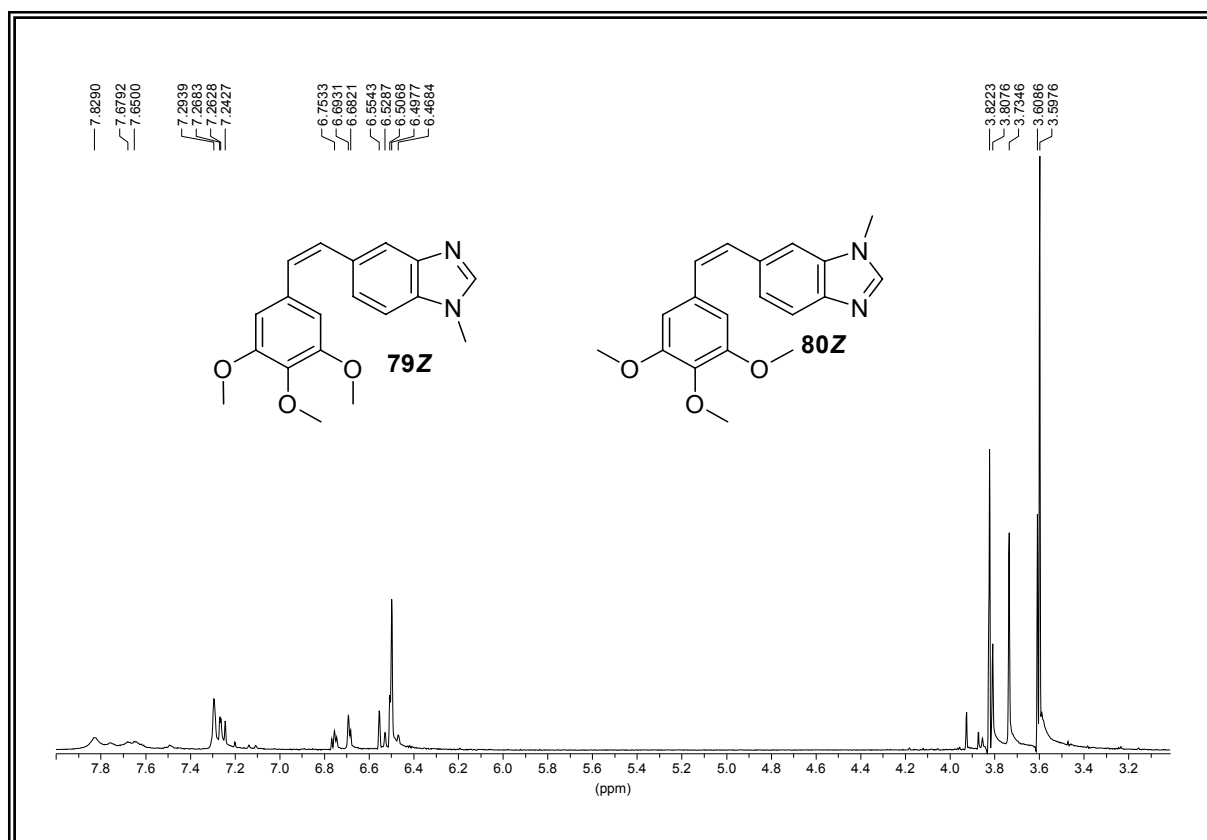


Figura LXIIa. Espectro de RMN ^1H de los compuestos **79Z** y **80Z**.

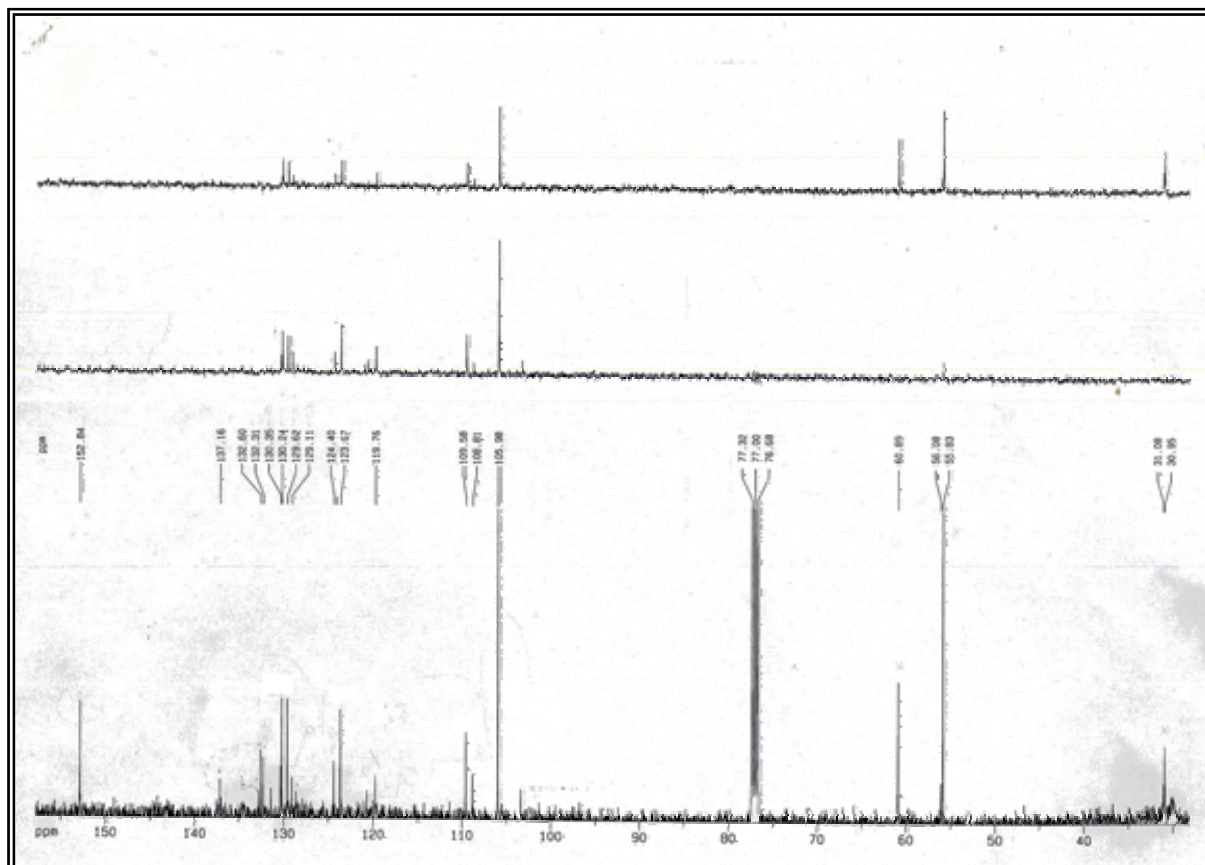


Figura LXIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **79Z** y **80Z**.

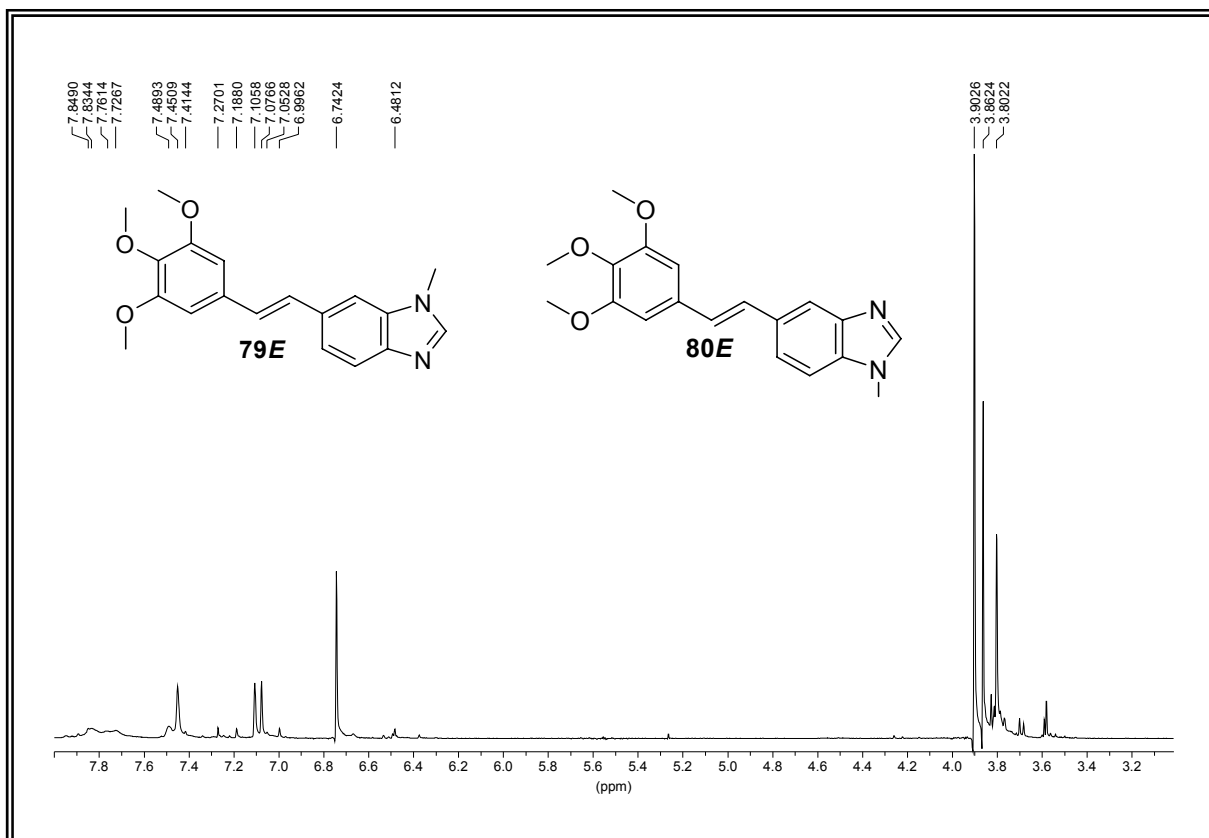


Figura LXIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **79E** ó **80E**.

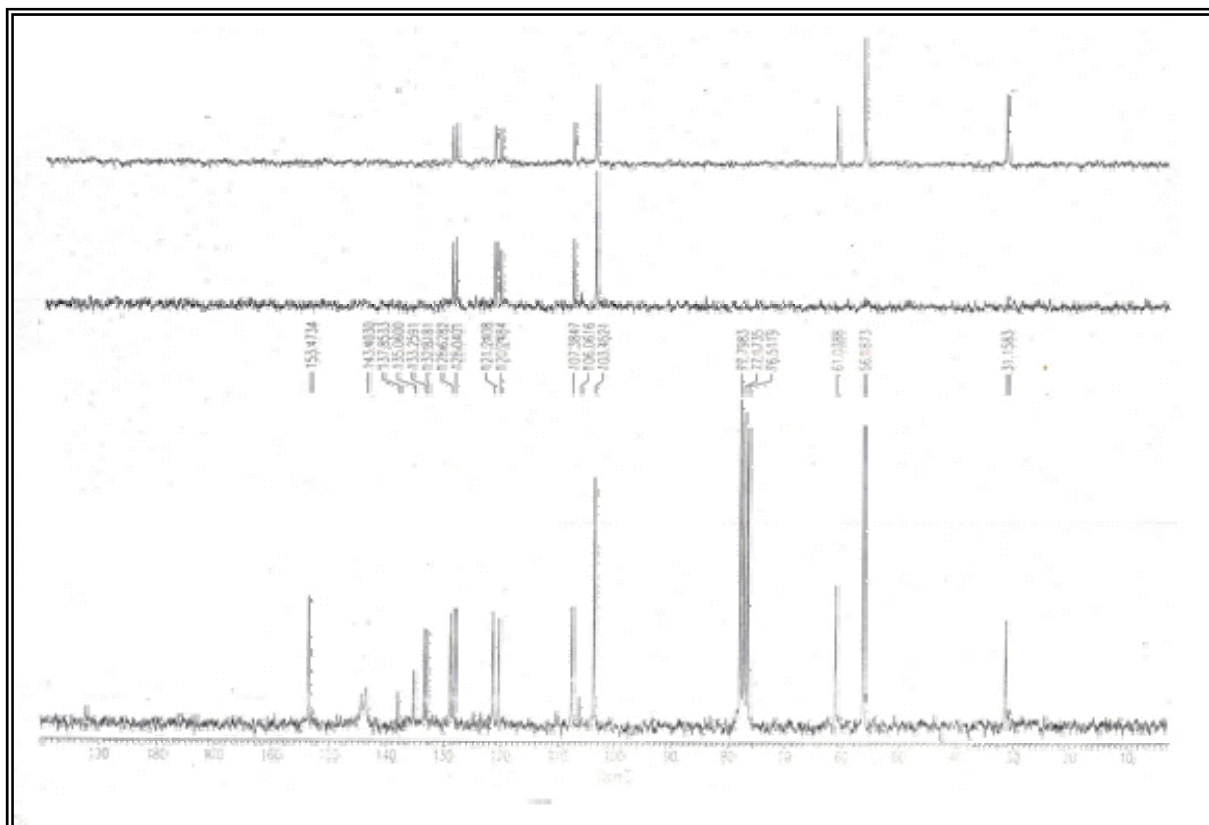


Figura LXIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **79E** y **80E**.

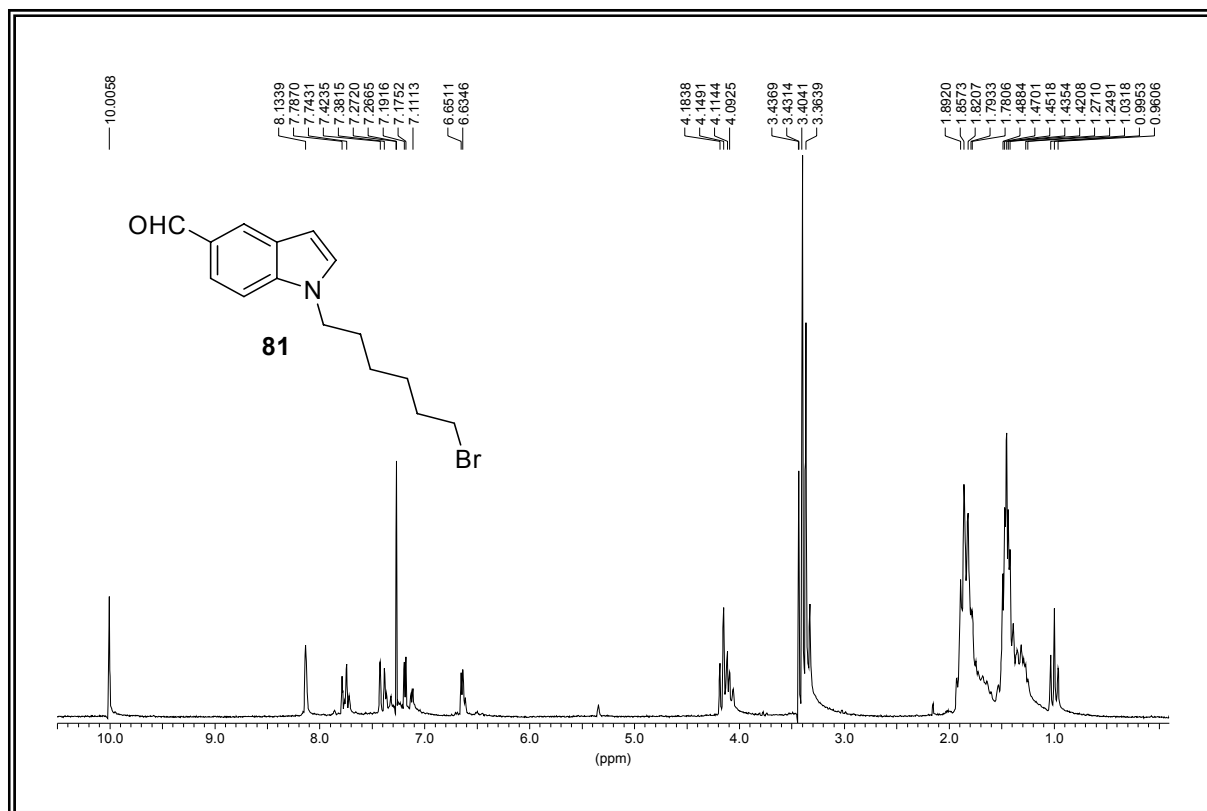


Figura LXIVa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **81**.

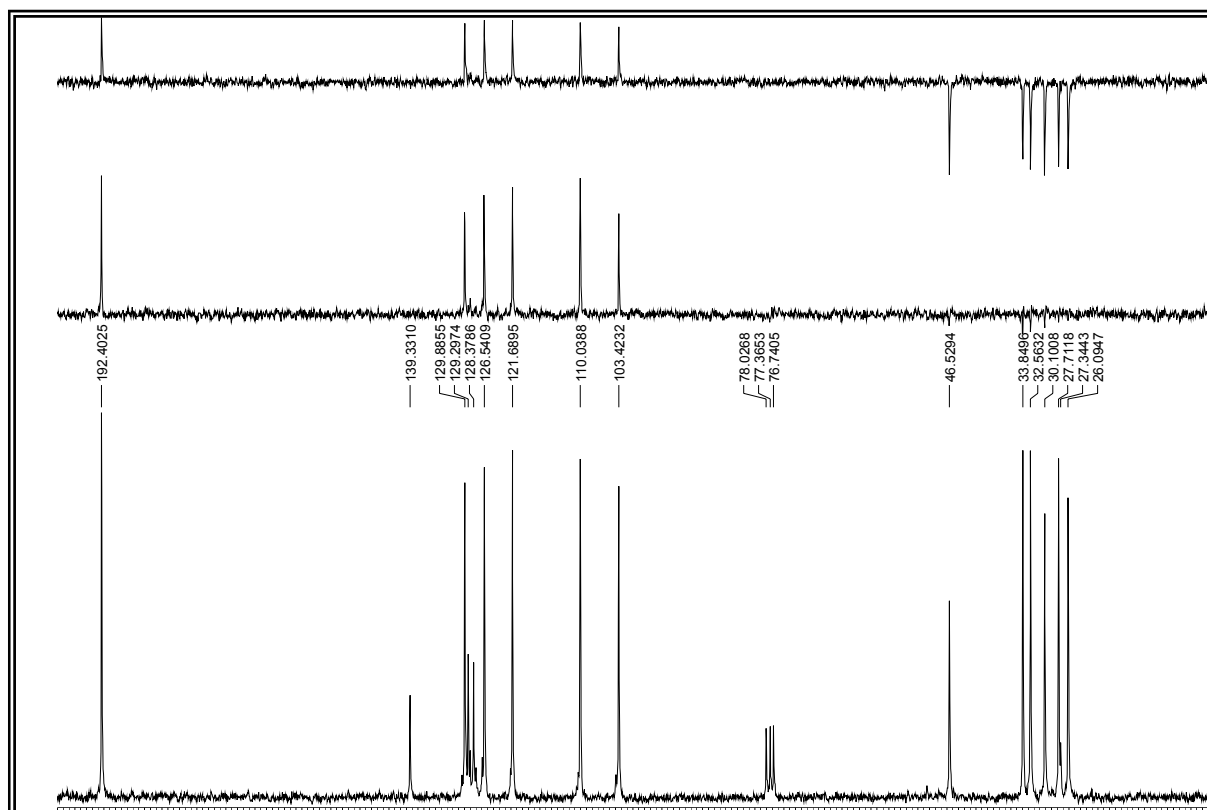


Figura LXIVb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **81**.

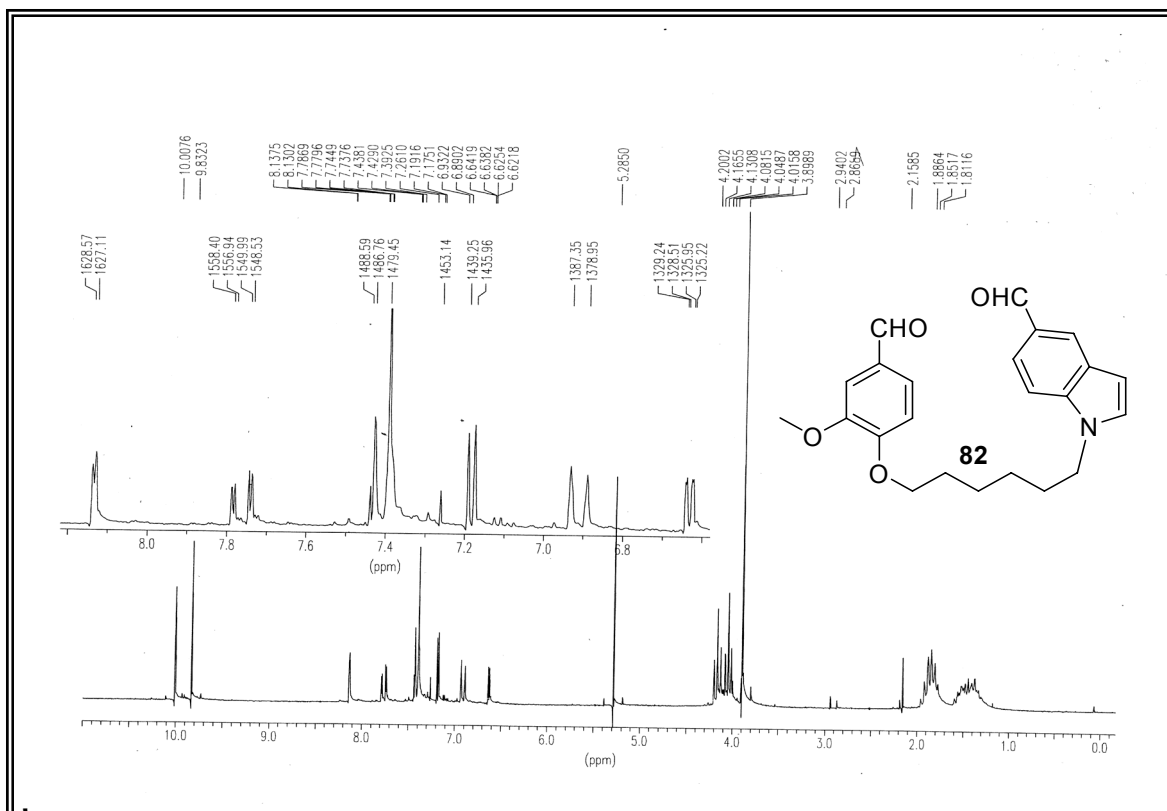


Figura LXVa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **82**.

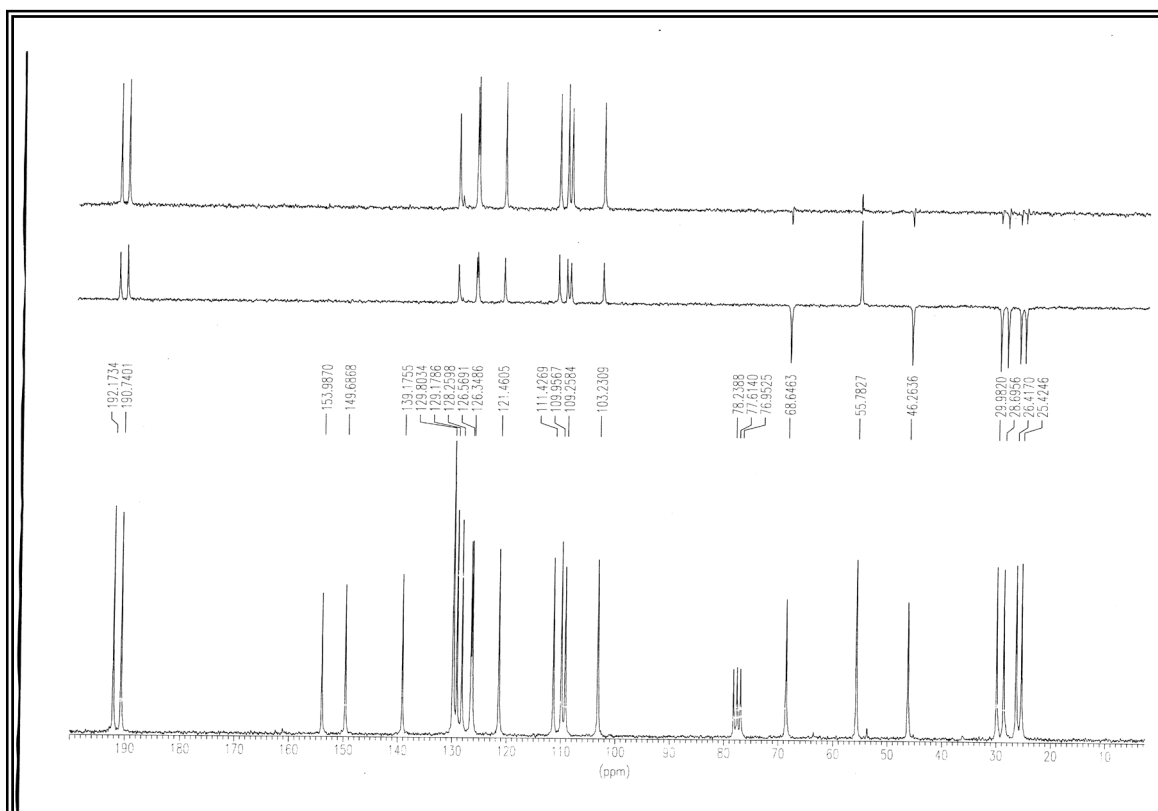


Figura LXVb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **82**.

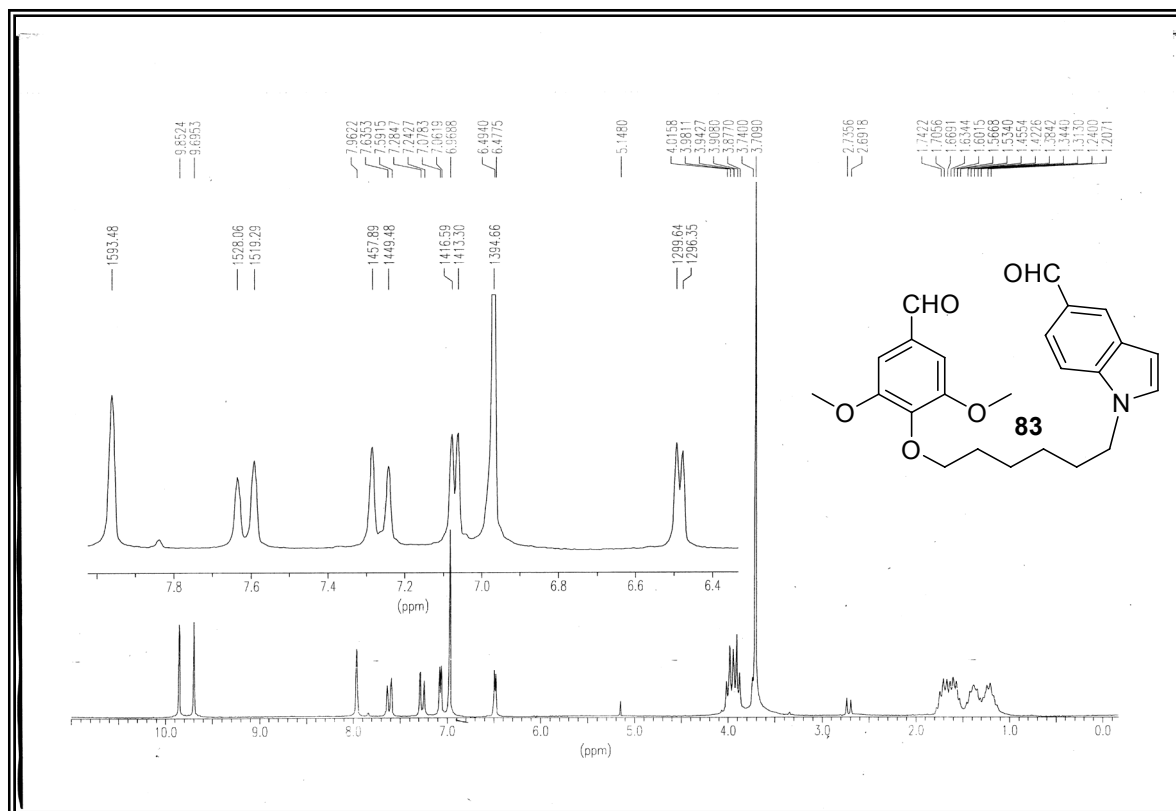


Figura LXVIa. Espectro de RMN ¹H del compuesto **83**.

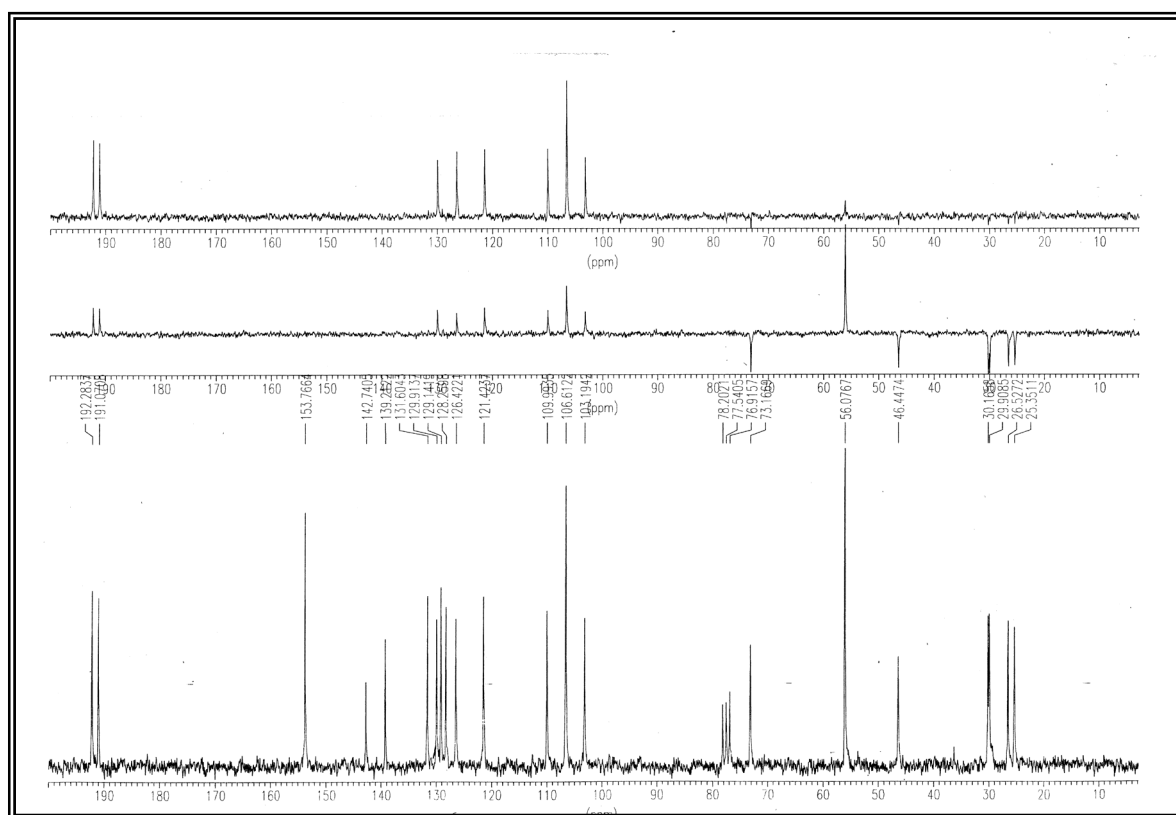


Figura LXVIb. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **83**.

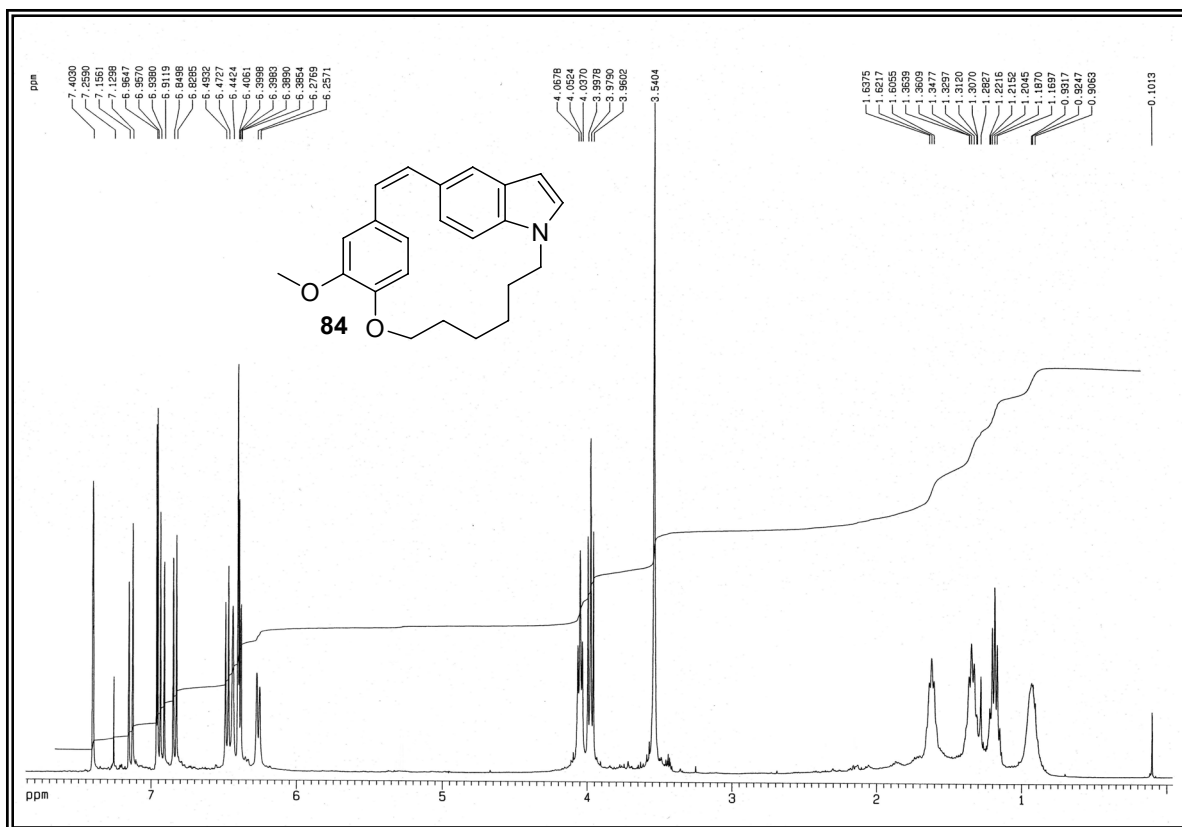


Figura LXVIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **84**.

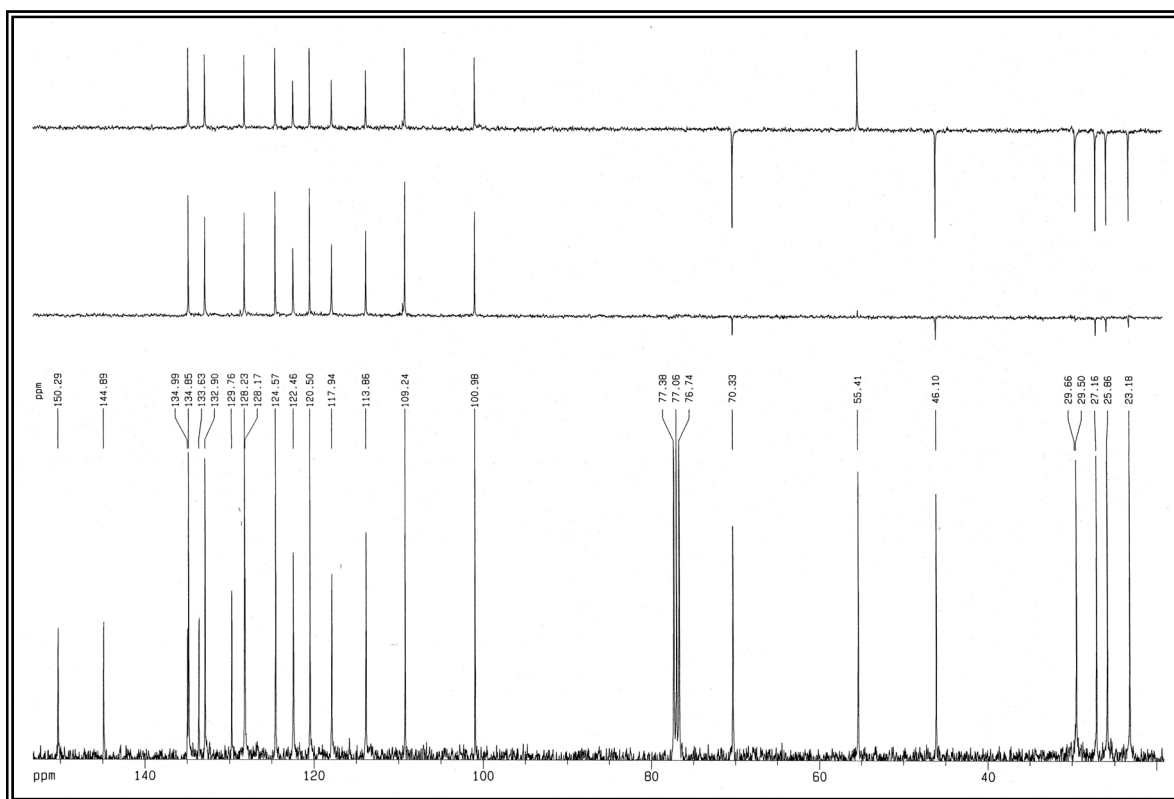


Figura LXVIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **84**.

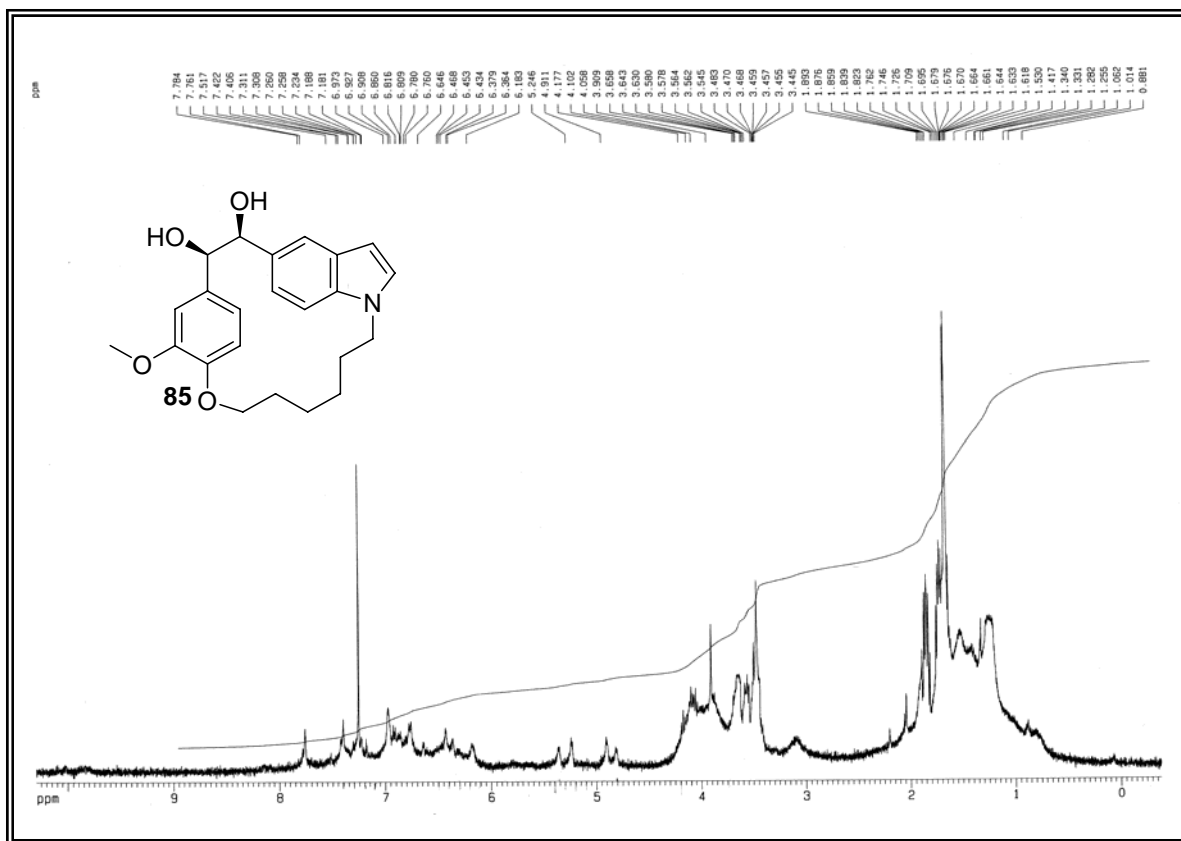


Figura LXVIII. Espectro de RMN ^1H del compuesto 85.

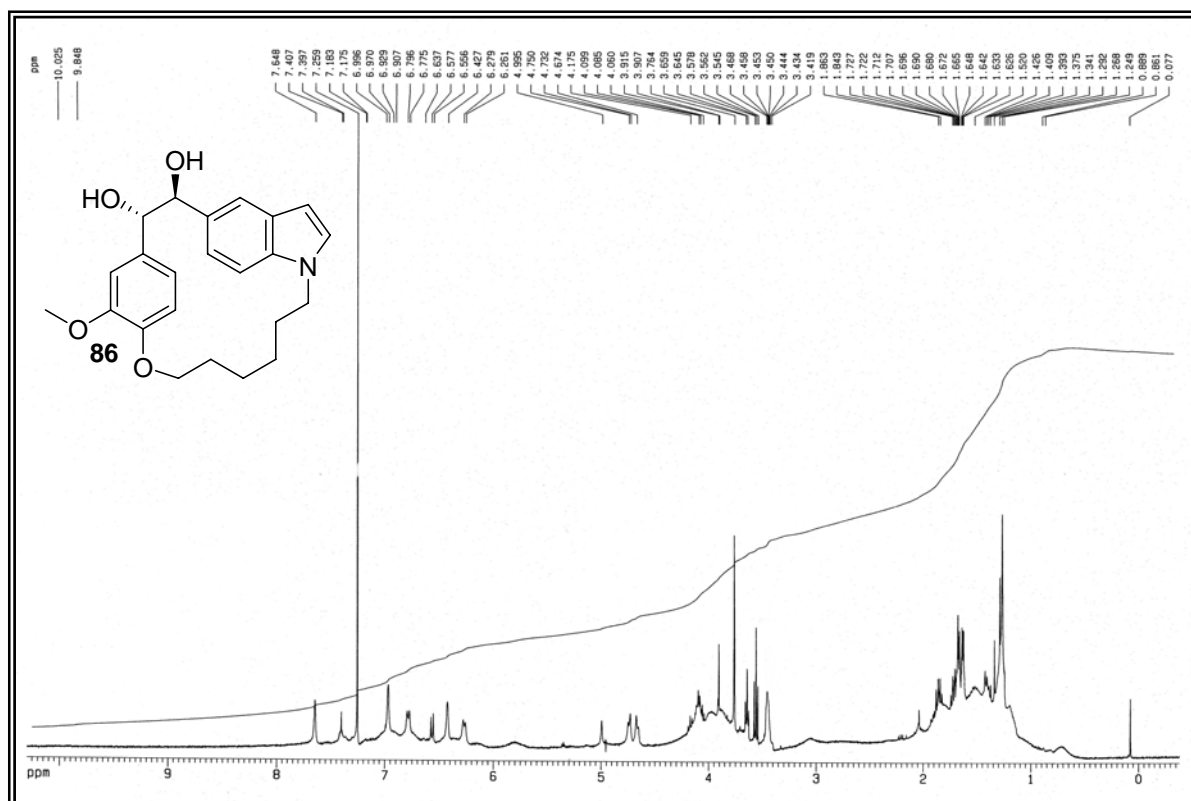


Figura LXIX. Espectro de RMN ^1H del compuesto 86.

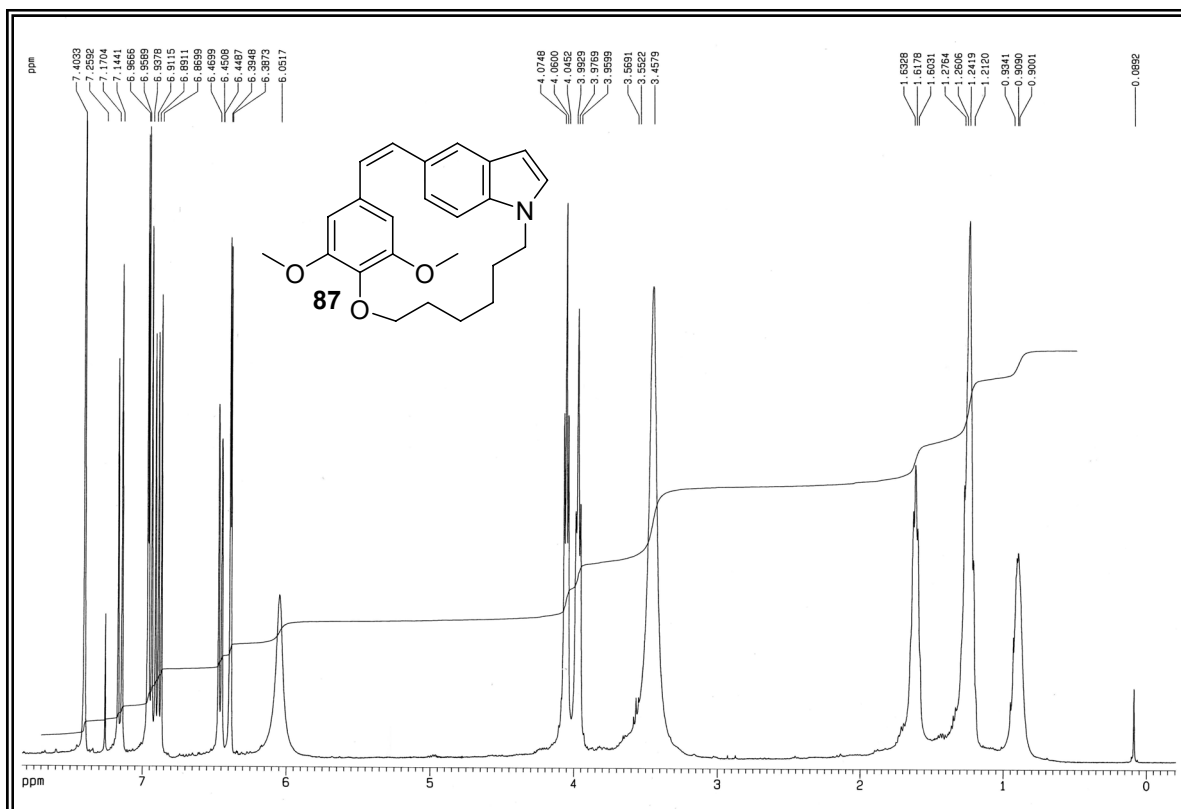


Figura LXXa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **87**.

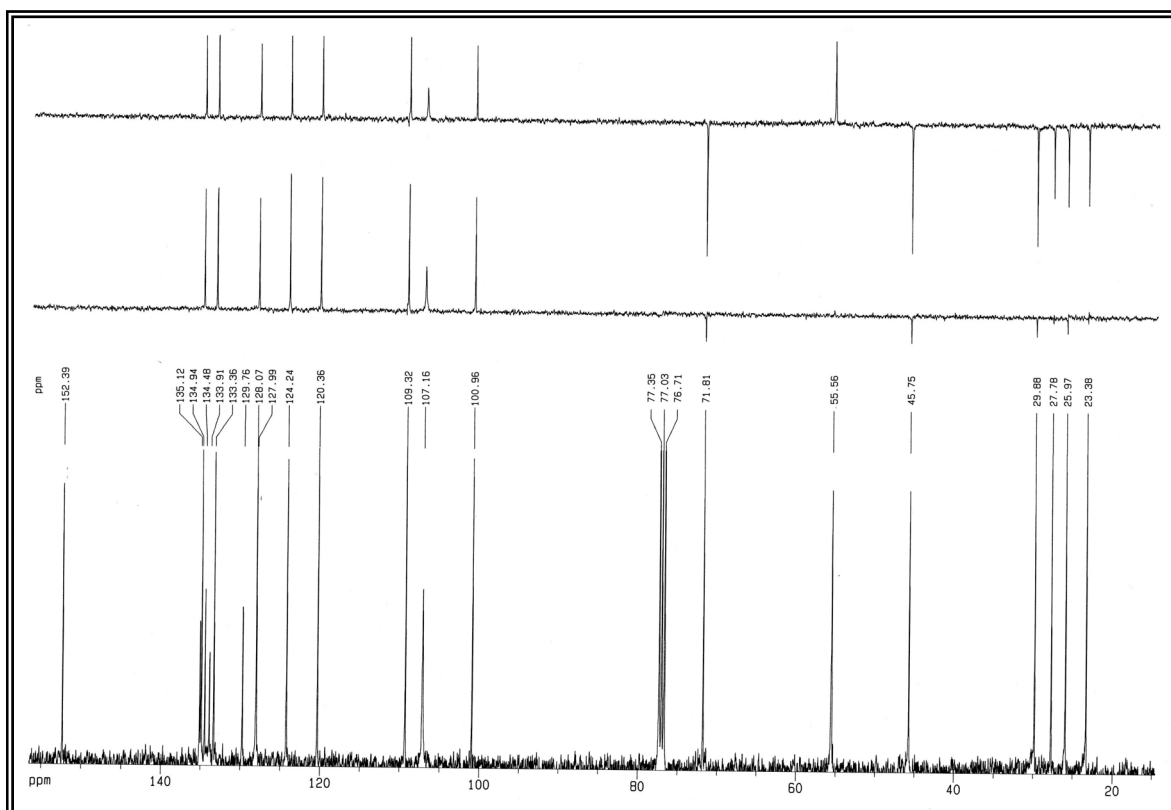


Figura LXXb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **87**.

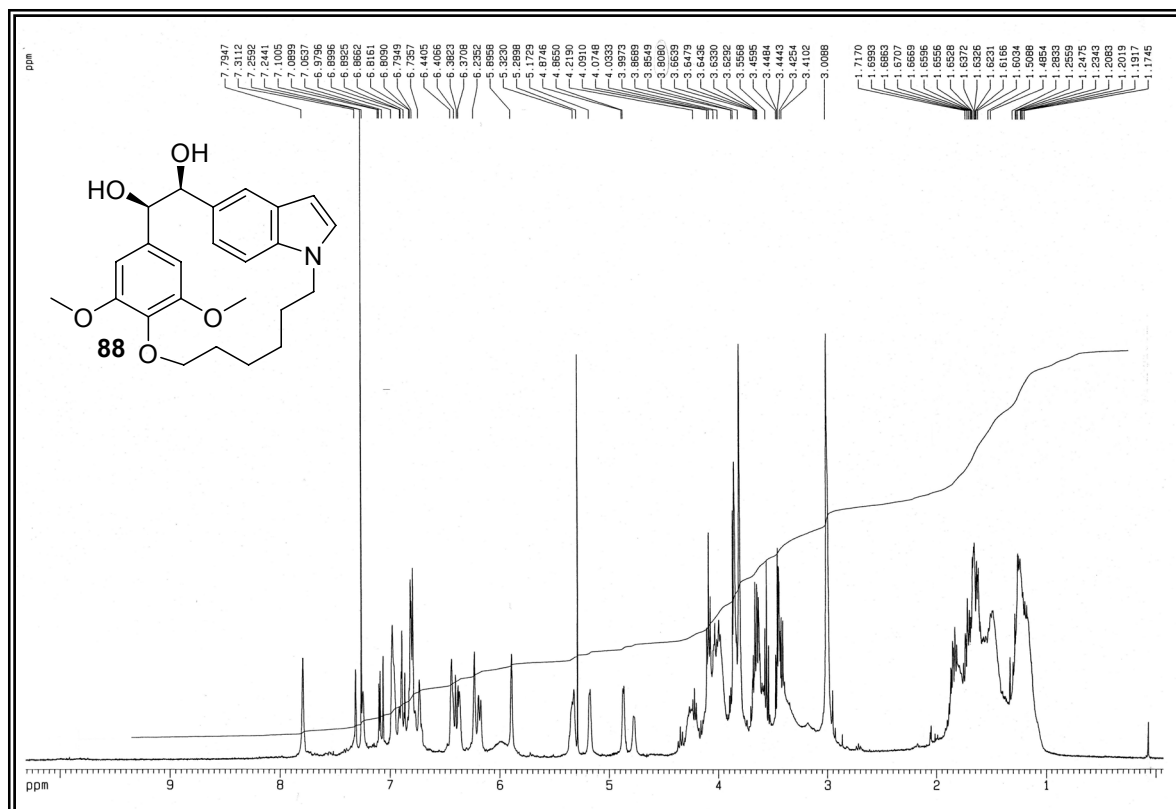


Figura LXXIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **88**.

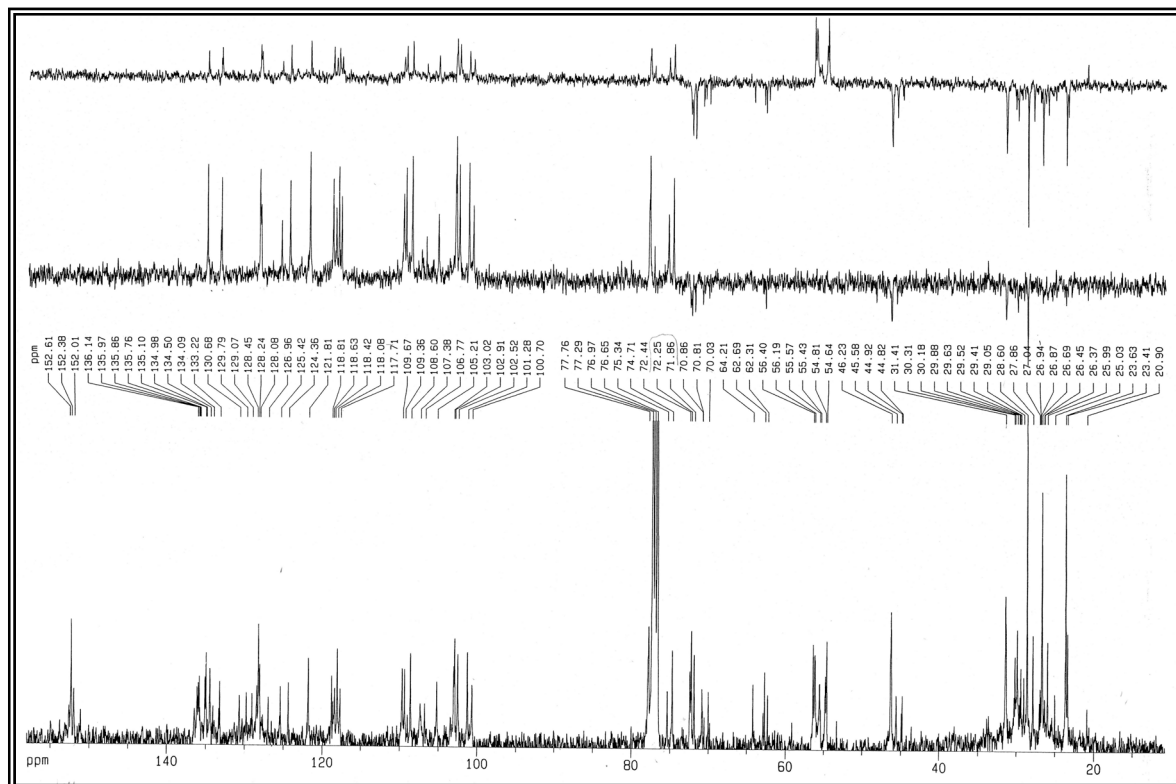


Figura LXXIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **88**.

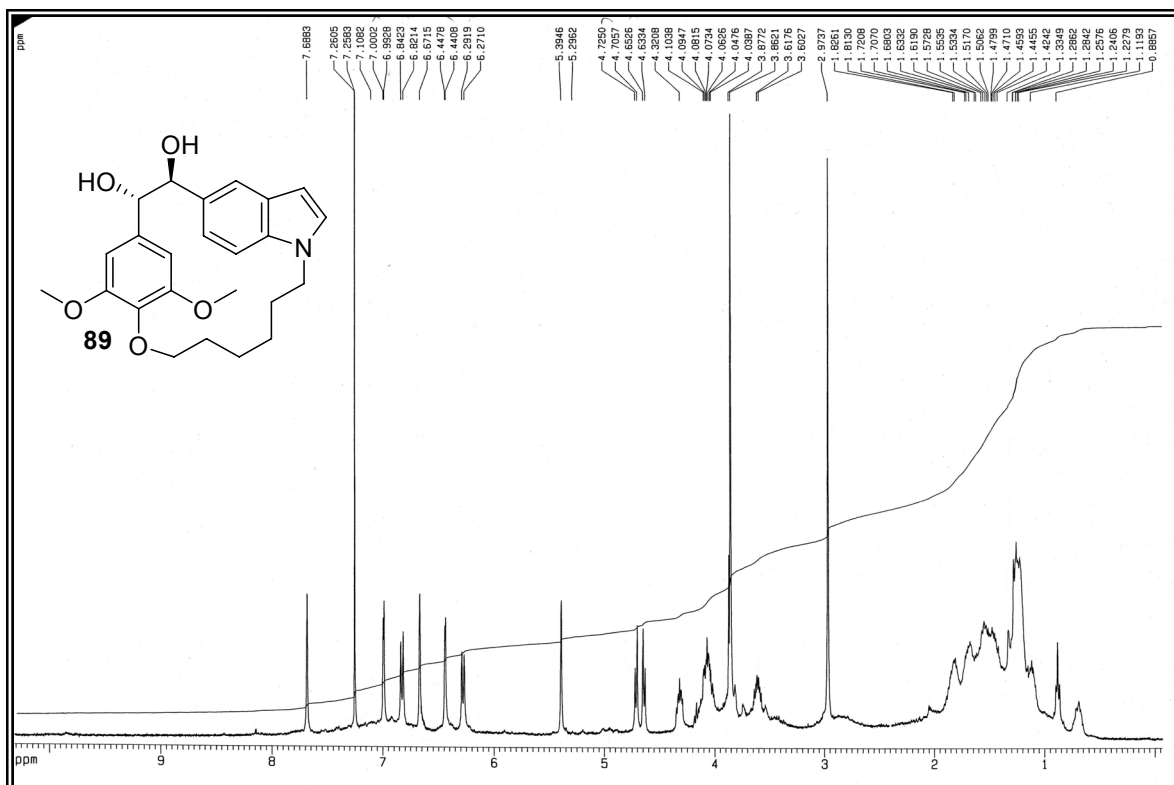


Figura LXXIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **89**.

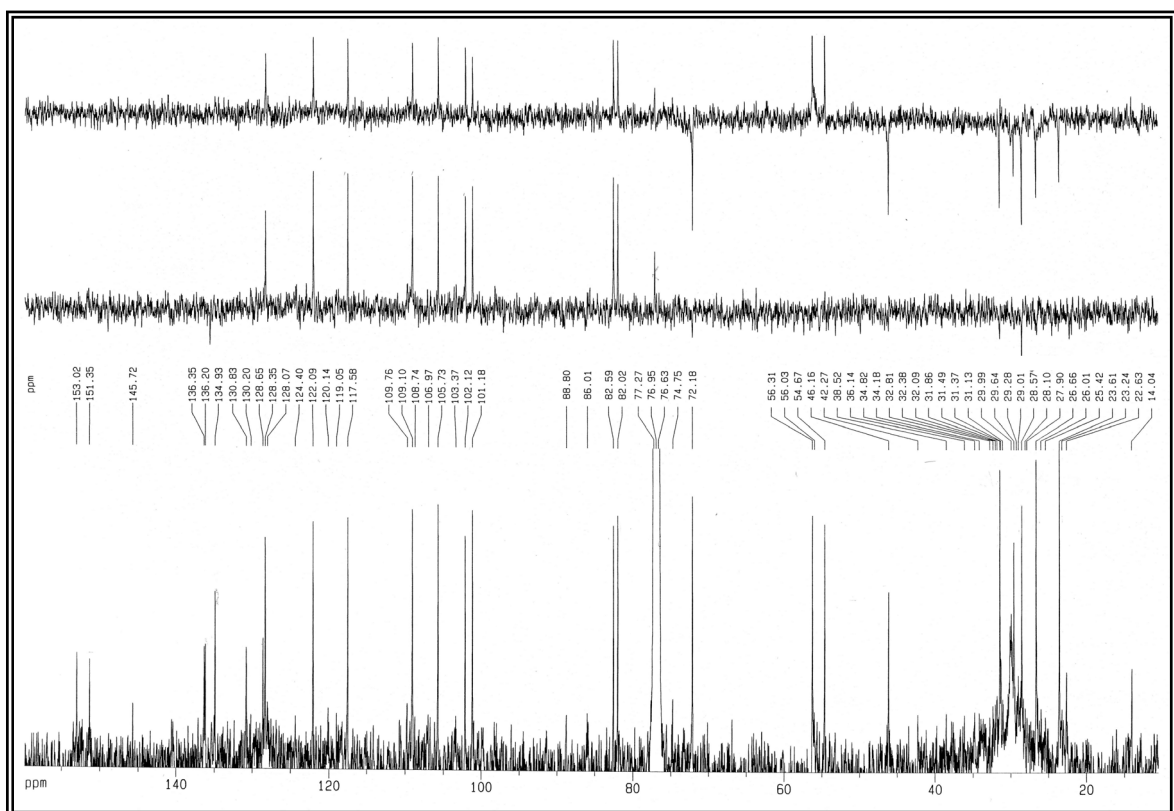


Figura LXXIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **89**.

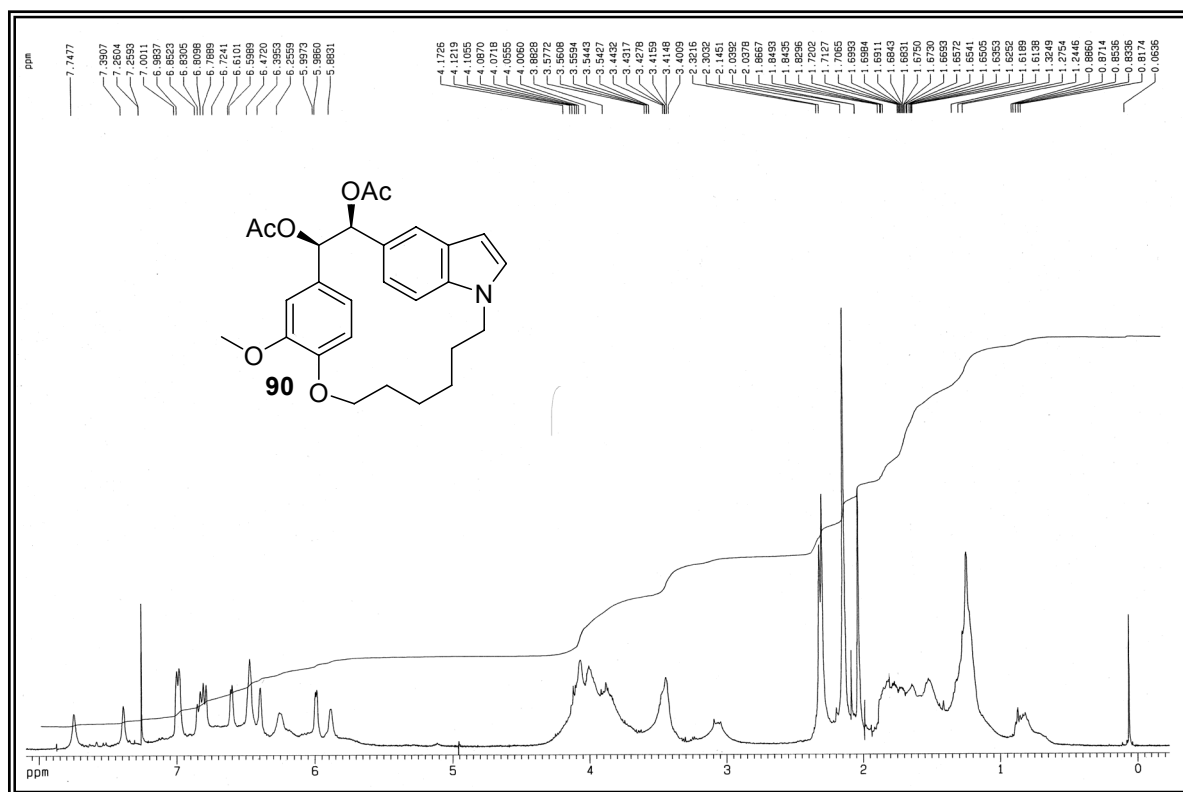


Figura LXXIIIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **90**.

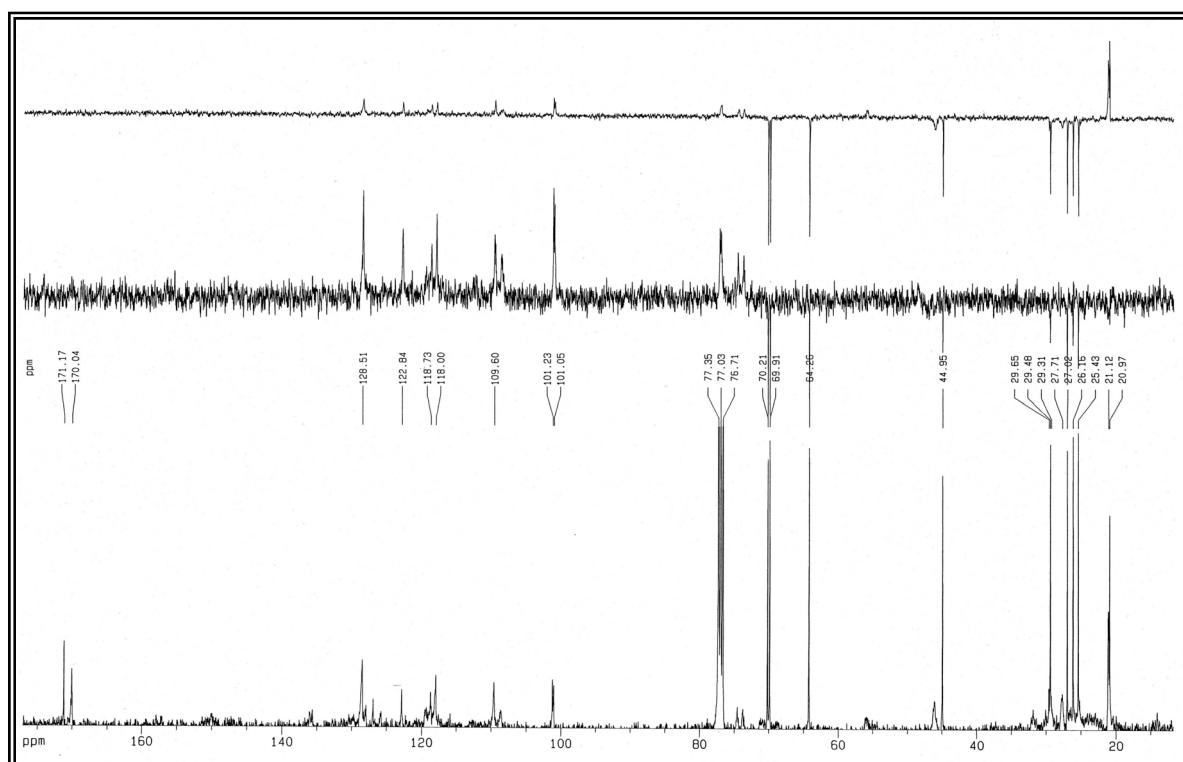


Figura LXXIIIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **90**.

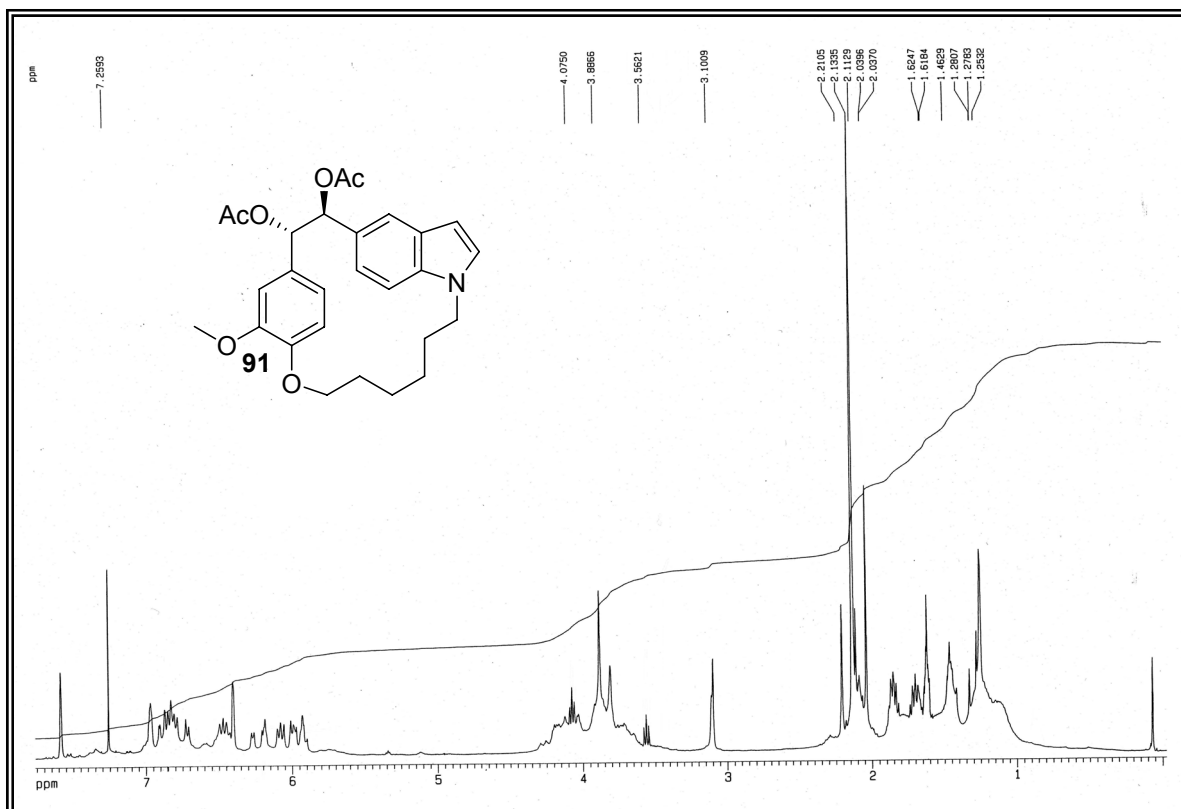


Figura LXXIVa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **91**.

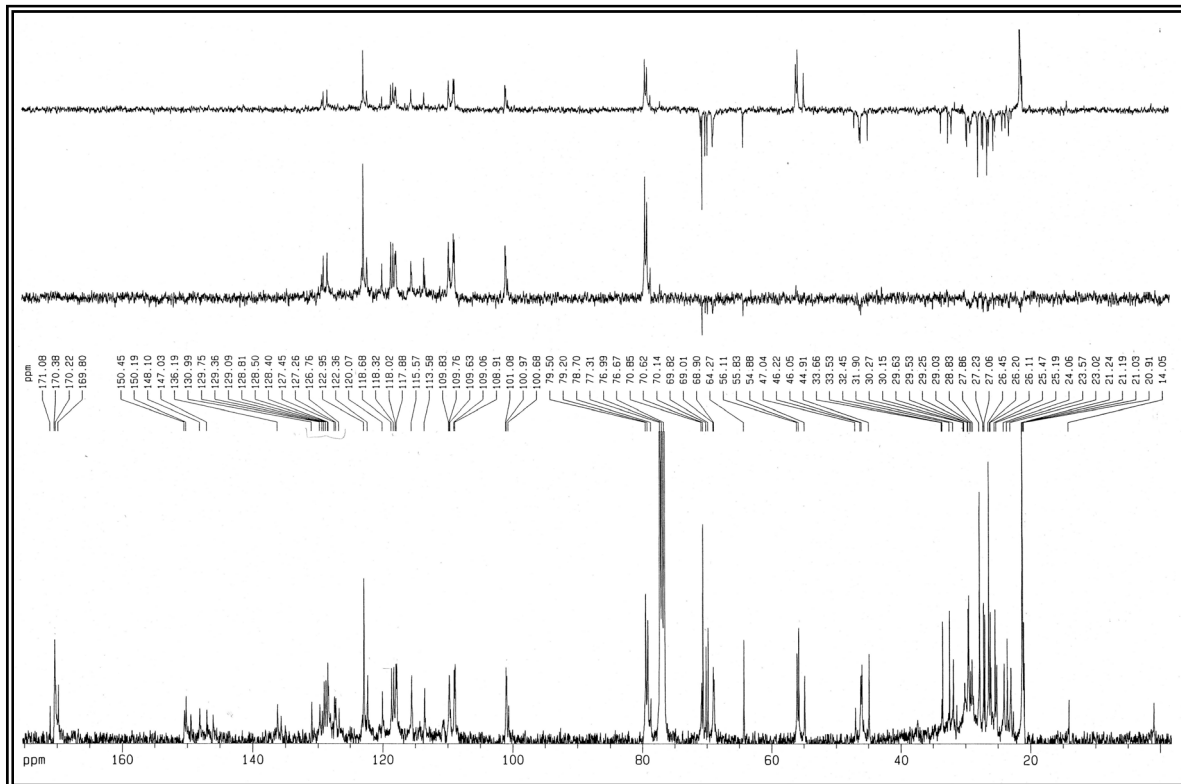


Figura LXXIVb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **91**.

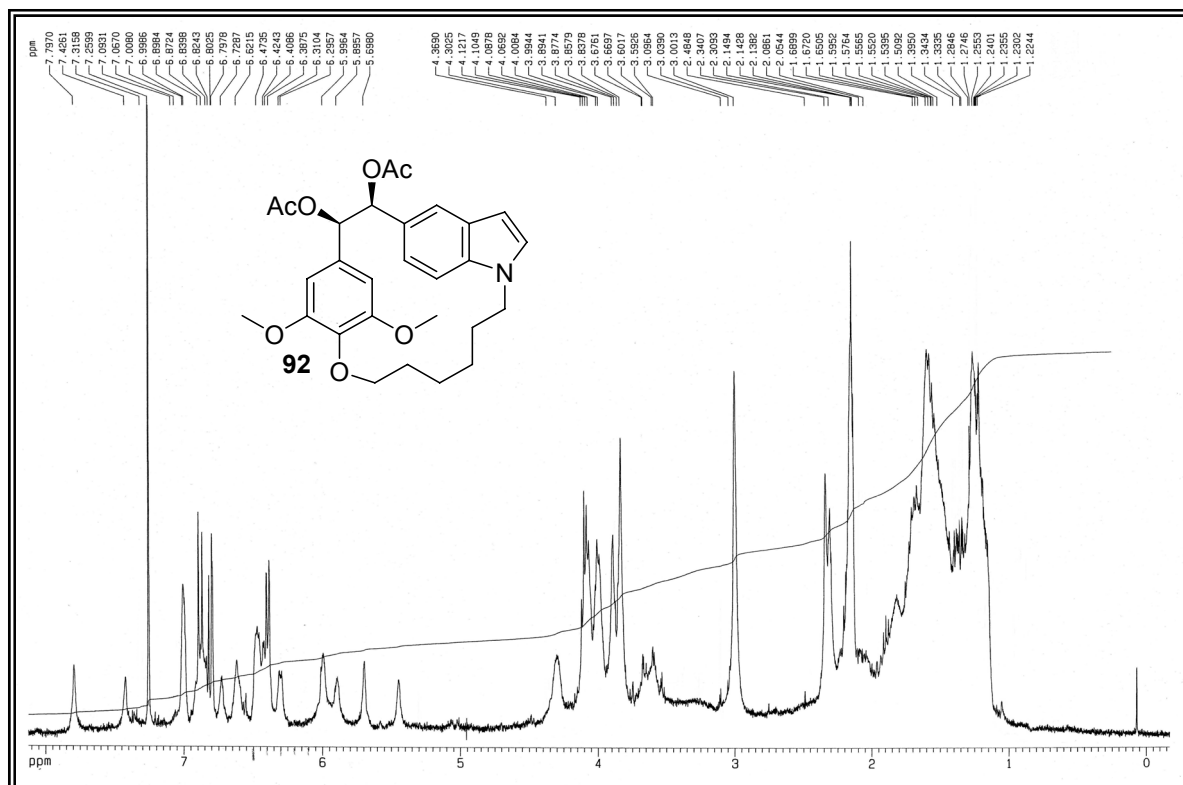


Figura LXV. Espectro de RMN ¹H del compuesto **92**.

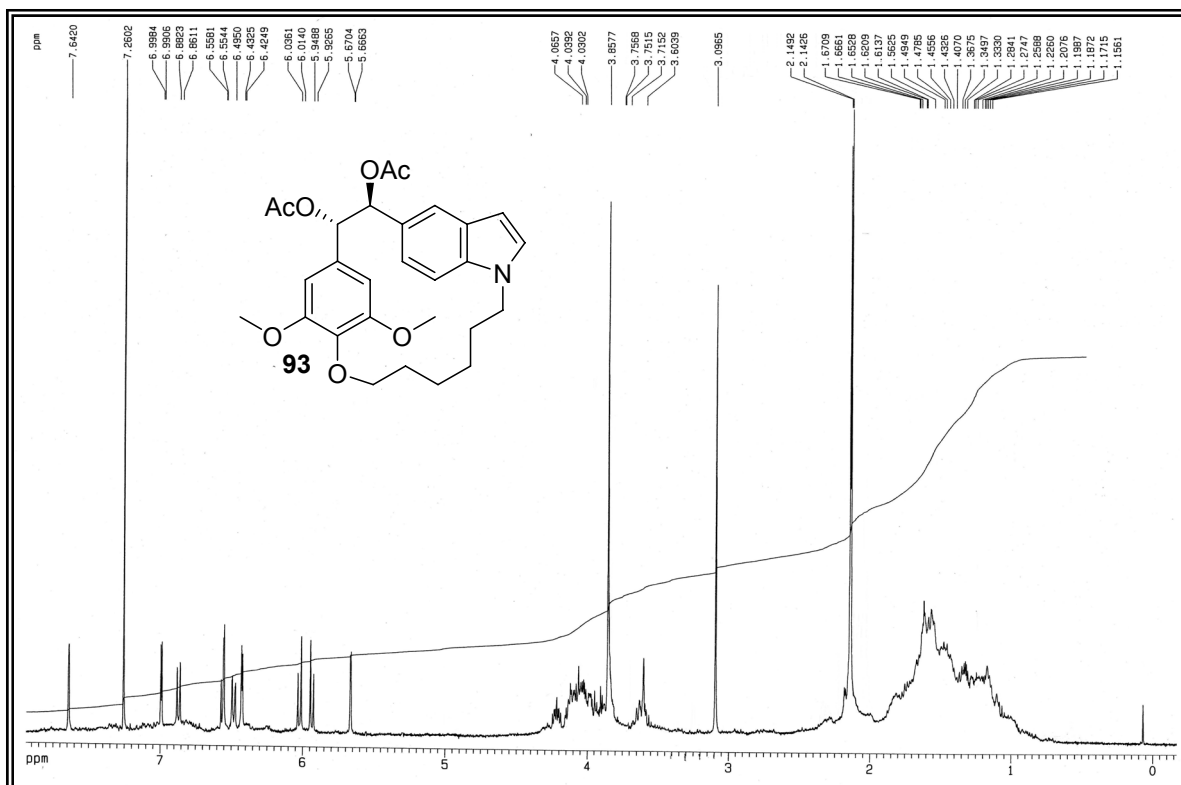


Figura LXXVIa. Espectro de RMN ^1H del compuesto **93**.

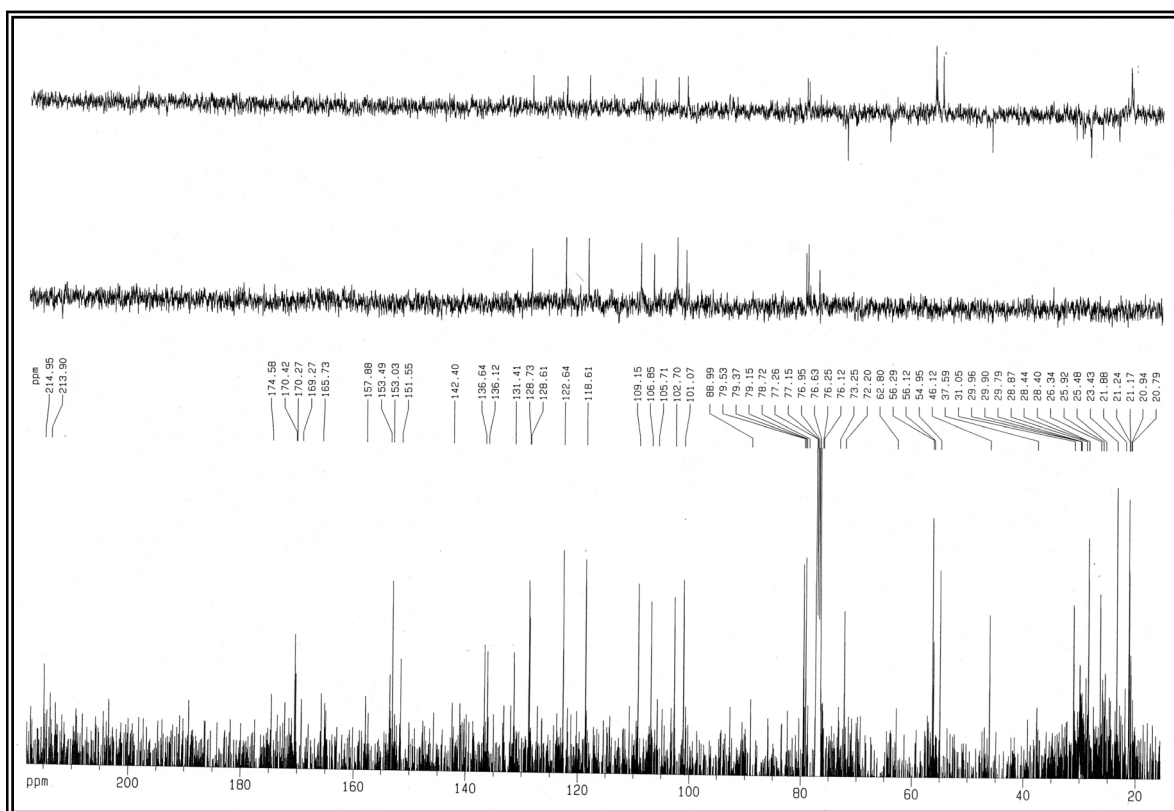


Figura LXXVIb. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **93**.