

# NUEVOS INHIBIDORES DE GLICOSIDASAS. ANÁLOGOS DE CALISTEGINAS



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

**Yaiza Hernández González**

**-Trabajo de Fin de Máster-**

**Tutores**

**Dr. David Díez Martín**

**Dr. Pablo Anselmo García García**

**Máster en Desarrollo y Evaluación de Medicamentos**

**Julio 2016**



# ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción y antecedentes	1
2.1. Introducción	1
2.2. Antecedentes	8
3. Objetivos	9
4. Discusión de resultados	10
4.1. Síntesis química	10
4.2. Estudio toxicológico	19
5. Metodología	22
5.1. Técnicas generales de síntesis y caracterización	22
5.2. Purificación de reactivos y disolventes	23
5.3. Metodología de síntesis	23
5.4. Metodología del estudio toxicológico	37
6. Conclusiones	40
7. Bibliografía	41
Anexo I	44
Anexo II	52



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **Ar:** aromático
- **AcOEt:** acetato de etilo
- **Bn:** bencilo
- ***n*BuLi:** *n*-butil litio
- **CC:** Cromatografía en Columna
- **CCF:** Cromatografía en Capa Fina
- **d:** doblete
- **DA:** dopamina
- **DAT:** transportador de dopamina
- **DCM:** diclorometano
- **dd:** doble doblete
- **DEPT:** Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
- **DIBAL-H:** hidruro de diisobutil aluminio
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **dt:** doble triplete
- **δ:** desplazamiento químico
- **ESI:** ElectroSpray Ionization
- ***et al.*:** y colaboradores
- **Et<sub>2</sub>O:** dietiléter o éter
- **hpf:** horas post-fecundación
- **HPLC:** High-Performance Liquid Chromatography
- **HRMS:** High Resolution Mass Spectrometry
- **IR:** infrarrojo
- ***J*:** constante de acoplamiento
- **LUMO:** Lowest energy Unoccupied Molecular Orbital
- **m:** multiplete
- **Me:** metilo
- **MsCl:** cloruro de metanosulfonilo (mesilo)
- **NET:** transportador de norepinefrina
- **NSS:** simportadores de neurotransmisores/sodio
- **Nu:** nucleófilo
- **pf:** punto de fusión
- **Pi:** piridina
- **Ph:** fenilo
- **q:** cuartete
- **RCM:** metátesis de cierre de anillo
- **RMN:** Resonancia Magnética Nuclear
- **s:** singlete
- **sa:** singlete ancho
- **SERT:** transportador de serotonina
- **S<sub>N</sub>:** sustitución nucleofílica
- **t:** triplete
- **t.a.:** temperatura ambiente
- **THF:** tetrahidrofurano



# 1. Resumen

---

Los iminoazúcares son alcaloides polihidroxiados, miméticos de los carbohidratos, en los que el oxígeno endocíclico del azúcar se ha reemplazado por un átomo de nitrógeno. Son inhibidores de glicosidasas, por lo que es posible su utilización en el tratamiento de numerosas enfermedades. En concreto, las calisteginas son alcaloides *nor*-tropanos que poseen el esqueleto bicíclico de la cocaína. Las calisteginas son los iminoazúcares menos estudiados hasta el momento, lo que permite plantear nuevas metodologías para su obtención. En este trabajo se ha logrado la síntesis de un análogo de calistegina, así como de tres compuestos análogos de cocaína, todos ellos potencialmente bioactivos. Adicionalmente, se ha realizado el estudio toxicológico de dichos análogos de cocaína utilizando como modelo embriones del pez cebra.

## 2. Introducción y antecedentes

---

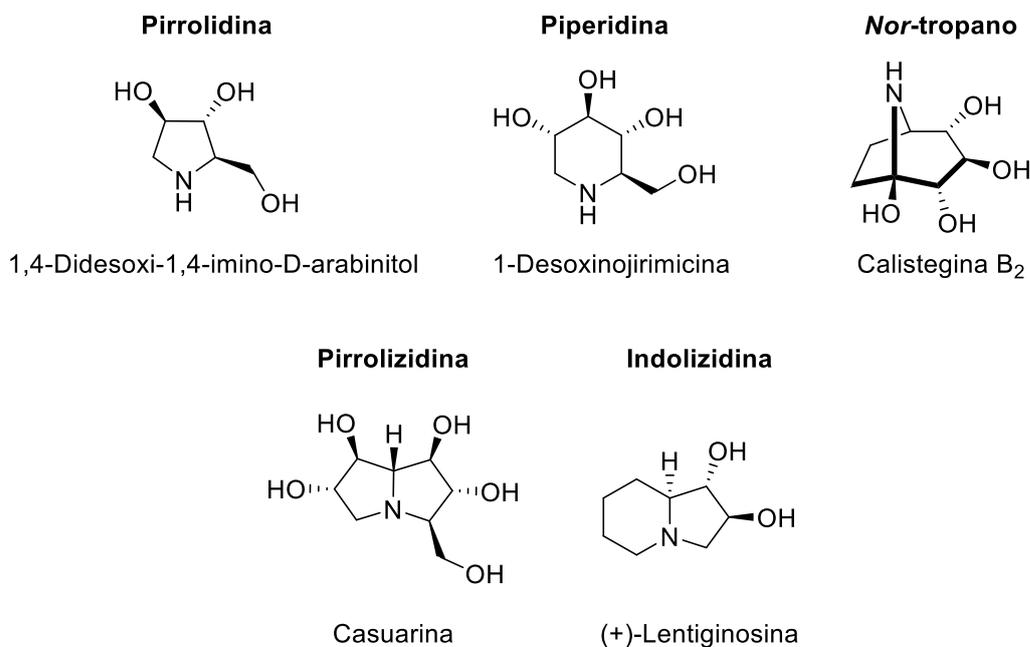
### **2.1. Introducción**

Uno de los principales objetivos de la Química Orgánica es la síntesis de compuestos biológicamente activos para su aplicación en el tratamiento de enfermedades. Los productos naturales siguen siendo el modelo ideal en el desarrollo de fármacos por la complejidad estructural, arquitectura tridimensional y propiedades biológicas útiles. Su complejidad y riqueza en centros estereogénicos ha inspirado a generaciones de químicos sintéticos en el diseño de nuevas estrategias diastereo y enantioselectivas, con el objetivo de conseguir compuestos que reproduzcan la diversidad estructural presente en los productos naturales.<sup>1</sup>

Dentro de los compuestos naturales destacan los alcaloides,<sup>2</sup> que son aquellas sustancias de bajo peso molecular que contienen un nitrógeno endocíclico procedente del metabolismo de aminoácidos. Los compuestos que se han sintetizado en este trabajo se incluyen dentro de este grupo. A continuación, se van a describir algunos de estos alcaloides de especial importancia.

### 2.1.1. Iminoazúcares: inhibidores de glicosidasas

Los iminoazúcares,<sup>3,4</sup> también denominados aza-azúcares o alcaloides polihidroxiados pertenecen al grupo de los alcaloides. Estos compuestos son miméticos de los carbohidratos, en los que el oxígeno endocíclico del azúcar se ha reemplazado por un átomo de nitrógeno, lo que conduce a notables propiedades biológicas y plantea muchos retos en la síntesis orgánica. Hasta el momento se han aislado de plantas y microorganismos una gran variedad de alcaloides polihidroxiados, tanto monocíclicos como bicíclicos, existiendo en la naturaleza cinco estructuras principales de iminoazúcares: pirrolidinas, piperidinas, pirrolizidinas, indolizidinas y *nor*-tropanos; como se indica en la **Figura 1**. Las calisteginas, objeto de estudio de este trabajo, se encuentran dentro de los *nor*-tropanos.

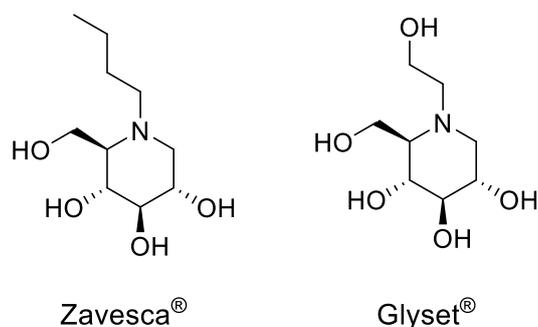


**Figura 1.** Ejemplos de estructuras de los distintos tipos de iminoazúcares

Debido a la analogía estructural que presentan con los carbohidratos, los iminoazúcares pueden ocupar su lugar en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos, inhibiendo la acción de las glicosidasas y glicotransferasas. Las glicosidasas son las enzimas que se encargan de hidrolizar los enlaces glicosídicos de los carbohidratos complejos y glicoconjugados en general.<sup>5</sup> Junto con las glicotransferasas, las glicosidasas forman la mayor maquinaria catalítica en la síntesis y ruptura de enlaces glicosídicos.

La actividad de las glicosidasas es fundamental en muchos procesos biológicos como la degradación de los polisacáridos de la dieta en monosacáridos, capaces de absorberse metabólicamente y ser usados por el organismo, el catabolismo lisosomal de glicoconjugados y la biosíntesis de glicoproteínas y glicolípidos. Las múltiples funciones de las glicosidasas en el organismo justifican la búsqueda de inhibidores potencialmente terapéuticos para su uso en el tratamiento de diabetes, obesidad, desórdenes en el almacenamiento lisosomal de glicoesfingolípidos, VIH y tumores en general.<sup>6</sup>

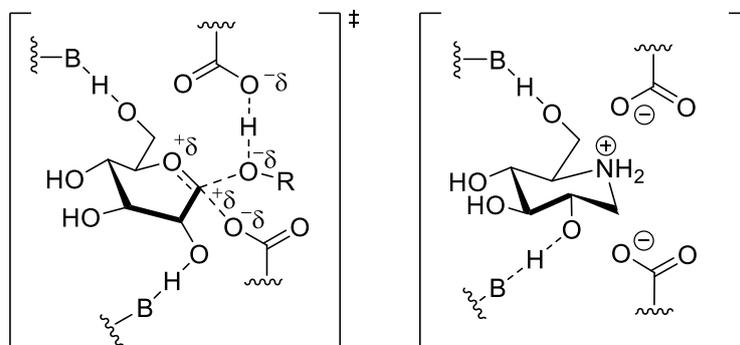
Actualmente existen fármacos comercializados basados en iminoazúcares, como Zavesca<sup>®</sup>, para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y de Niemann-Pick, y Glyset<sup>®</sup>, para el tratamiento de la diabetes mellitus (**Figura 2**).



**Figura 2.** Estructuras de Zavesca<sup>®</sup> y Glyset<sup>®</sup>

La gran potencia y especificidad de los iminoazúcares para actuar como inhibidores enzimáticos están relacionadas con su habilidad para imitar el estado transición de las unidades furanosa y piranosa de los sustratos naturales de las glicosidasas. Teniendo en cuenta que la ruptura parcial del enlace glicosídico intensifica la carga positiva generada en el oxígeno o en el carbono anomérico del glicósido natural, la sustitución de uno de los dos átomos por un nitrógeno protonado mimetiza, en el estado de transición, la carga en esos centros, de manera que se forma un complejo con la enzima glicosidasa (**Figura 3**). Las características principales de estos alcaloides, que consisten en la estabilización de la carga positiva del átomo de nitrógeno, el centro anomérico trigonal, la conformación de media silla y la configuración específica de los iones hidroxilo, son cruciales para su actividad. Por tanto, los factores estructurales relevantes para la inhibición de glicosidasas pueden estar relacionados con la carga y/o

la forma, definidas por la hibridación y la conformación del anillo de piranosa en los sustratos naturales o el anillo de piperidina en los inhibidores. Se considera que el inhibidor se encuentra protonado para interactuar mediante enlaces iónicos con el grupo carboxilo del sitio activo.<sup>6</sup>



**Figura 3.** Estado de transición para la hidrólisis de glicósidos (izquierda) y par iónico formado entre el iminoazúcar y el centro activo de la glicosidasa.

### 2.1.2. Calisteginas

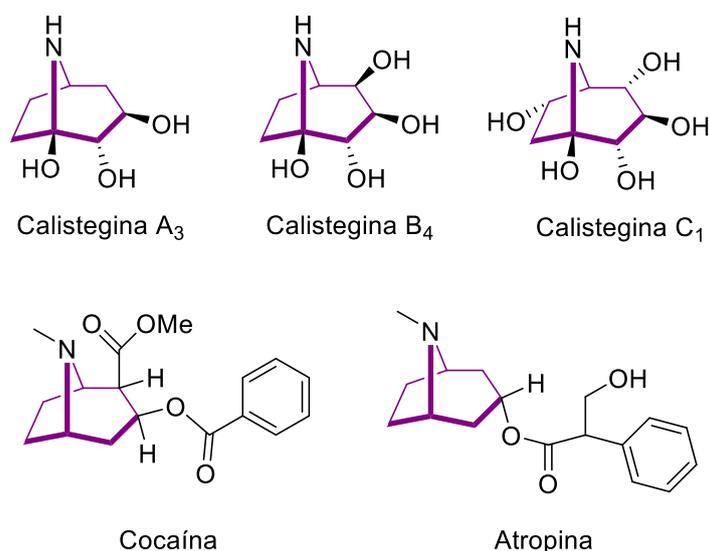
Las calisteginas son los iminoazúcares descubiertos más recientemente. Tepfer et al. (1988)<sup>7</sup> aislaron estos alcaloides por primera vez de las raíces de *Calystegia sepium* (Familia Convolvulaceae) como metabolitos secundarios de las plantas y se cree que su función es mediar la nutrición en la rizosfera. Posteriormente, se han aislado de otras especies de plantas<sup>8</sup> como *Convolvulus arvensis* (Familia Convolvulaceae), *Atropa belladonna* (Familia Solanaceae) y *Hyoscyamus albus* (Familia Solanaceae) así como de frutas, vegetales, polillas y mariposas.<sup>9</sup>



**Figura 4.** *Calystegia sepium* (izquierda) y *Atropa belladonna* (derecha)

Las calisteginas contienen un sistema azabicyclo[3.2.1]octano (*nor*-tropano), presente en otros alcaloides de importante actividad biológica como son la cocaína y la atropina (**Figura 5**). En el desarrollo de la síntesis de análogos de calisteginas planteado en este trabajo, se han sintetizado, además, sistemas bicíclicos oxa/aza-[3.2.1]octano (compuestos **8**, **9** y **11**). Estos últimos se pueden considerar análogos de cocaína potencialmente bioactivos. Por esta razón, se ha llevado a cabo su estudio toxicológico, que será descrito posteriormente.

En función del número de grupos hidroxilo presentes en la estructura, la familia de las calisteginas se divide en tres grandes grupos: calisteginas A (con tres grupos hidroxilo), calisteginas B (con cuatro grupos hidroxilo) y calisteginas C (con cinco grupos hidroxilo).<sup>10</sup> Algunos ejemplos de estas estructuras se muestran en la siguiente figura:



**Figura 5.** Ejemplos de compuestos de la familia de las calisteginas y comparación con la cocaína y la atropina

Al contrario que en el caso de otros iminoazúcares, la base estructural de la inhibición de glicosidasas mediante calisteginas es poco conocida. La calistegina B<sub>2</sub> (**Figura 1**), por ejemplo, es una amina bicíclica que combina un anillo de pirrolidina y un anillo de piperidina en su estructura, con un perfil de hidroxilación que proporciona unas propiedades similares a la 1-desoxinojirimicina. Sin embargo, las propiedades biológicas son totalmente diferentes: mientras que la 1-desoxinojirimicina es un potente inhibidor de  $\alpha$ -glicosidasas, la calistegina B<sub>2</sub> se comporta como un potente inhibidor específico de  $\beta$ -glicosidasas.<sup>6</sup>

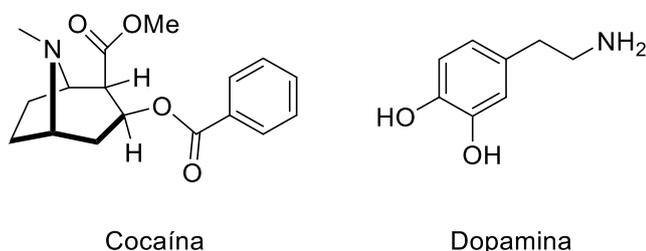
Hasta el momento, solamente se han sintetizado y estudiado algunas calisteginas no naturales. Por ello, es necesario desarrollar estrategias sintéticas eficientes, económicas y respetuosas con el medio ambiente, que permitan acceder a este tipo de compuestos.

### 2.1.3. Análogos de cocaína

La cocaína es un alcaloide derivado de la planta peruana *Erythroxylon coca* (Familia Erythroxylaceae). Se ha utilizado como estimulante durante siglos y, actualmente, se consume mayoritariamente como droga ilegal de uso recreativo en el hemisferio occidental, causando grandes pérdidas socioeconómicas. Sin embargo, tanto su mecanismo de acción como el riesgo de su abuso son todavía poco conocidos.<sup>11</sup>

Se ha sugerido que el transportador de dopamina (DAT) es la principal diana de acción de la cocaína. DAT (gen SLC6A3) es una proteína transmembrana que pertenece a la familia de simportadores de neurotransmisores/sodio (NSS), junto a otros transportadores como los de serotonina (SERT) y norepinefrina (NET). Los NSS comparten una topología común de 12 dominios transmembrana conectados por bucles extracelulares e intracelulares y requieren del cotransporte de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  junto a los neurotransmisores.<sup>12</sup>

DAT es responsable de la recaptación de dopamina (DA) (**Figura 6**) en la sinapsis, transportándola desde el espacio extracelular hacia el interior de la neurona presináptica, donde se almacena en vesículas para su posterior liberación. Por tanto, DAT modula la concentración extraneuronal de dopamina, lo cual es crucial para la correcta señalización dopaminérgica en el sistema nervioso central.

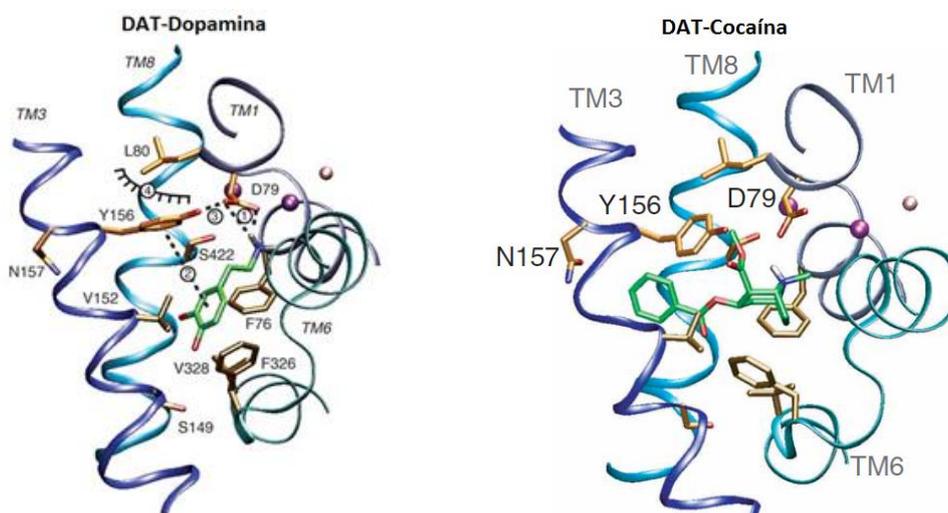


**Figura 6.** Estructuras de la cocaína y la dopamina

Se piensa que la disfunción de DAT contribuye a la aparición de trastornos dopaminérgicos tales como esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de déficit de

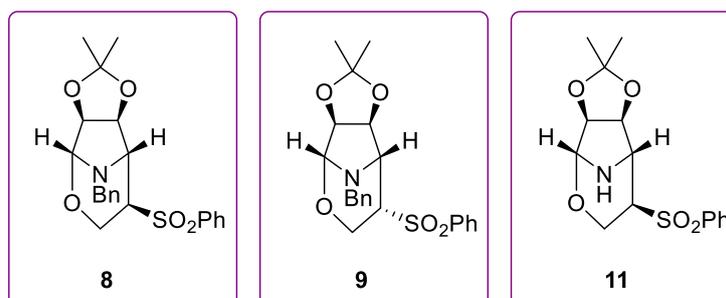
atención con hiperactividad, trastorno del espectro autista, síndrome de Tourette, enfermedad del Parkinson, síndrome hereditario de deficiencia de DAT y los comportamientos adictivos. Muchos fármacos (Ej. bupropion y metilfenidato) que se unen a DAT e inhiben el transporte, son utilizados terapéuticamente para regular la señalización dopaminérgica en estados de enfermedad, mientras que otros como la cocaína inducen estimulación psicomotora y adicción.<sup>13</sup>

La cocaína es un inhibidor con alta afinidad por DAT y se cree que su unión al transportador causa un rápido incremento en los niveles de dopamina extracelular, lo que produce efectos que conducen a su abuso. Se han llevado a cabo análisis de docking (**Figura 7**) para el estudio de la interacción entre DAT-cocaína/análogos, cuyo objetivo es el desarrollo de antagonistas para el tratamiento de la adicción a la cocaína.<sup>11</sup>



**Figura 7.** Interacción de la dopamina y la cocaína con el transportador DAT

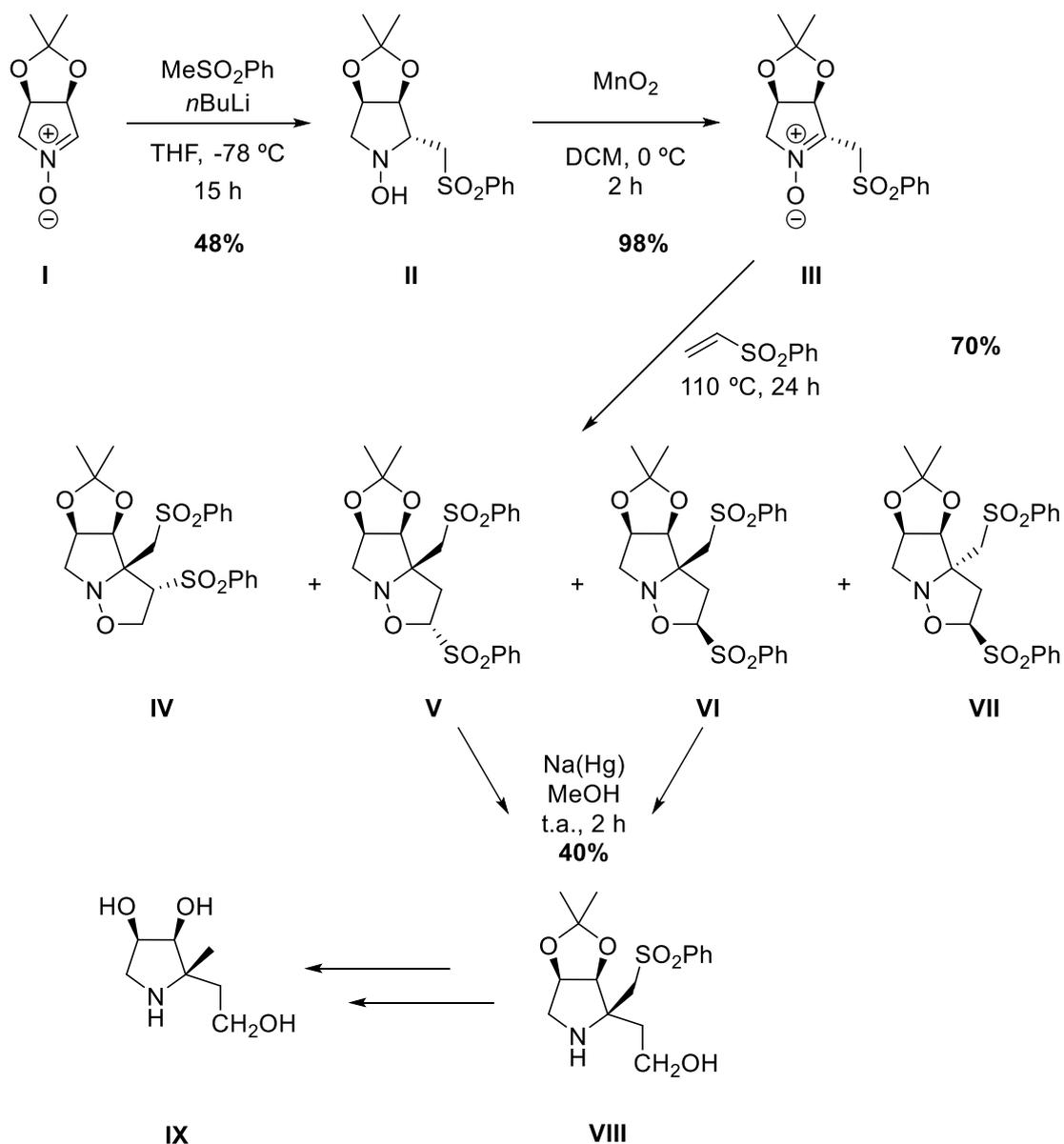
En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio toxicológico de los análogos de cocaína **8**, **9** y **11** (**Figura 8**). Estos compuestos son potencialmente bioactivos gracias a su similitud con la cocaína. Es importante conocer su toxicidad con el fin de determinar su posible futura aplicación terapéutica.



**Figura 8.** Análogos de cocaína **8**, **9** y **11**

## 2.2. ANTECEDENTES

Previamente, en el grupo de investigación de Química Orgánica se han realizado estudios de reactividad con nitronas y sulfonas, para la obtención de pirrolidinas polihidroxiadas inhibitoras de glicosidasas,<sup>14</sup> como se muestra en el **Esquema 1**:

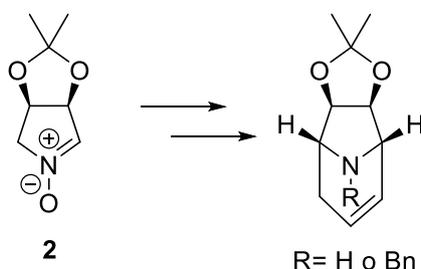


**Esquema 1.** Transformación de la nitrona I en la pirrolidina IX inhibitora de glicosidasas

### 3. Objetivos

---

El objetivo general de este trabajo es sintetizar análogos de calisteginas a partir de la nitrona **2**.



**Figura 9.** Síntesis de análogos de calisteginas a partir de la nitrona **2**

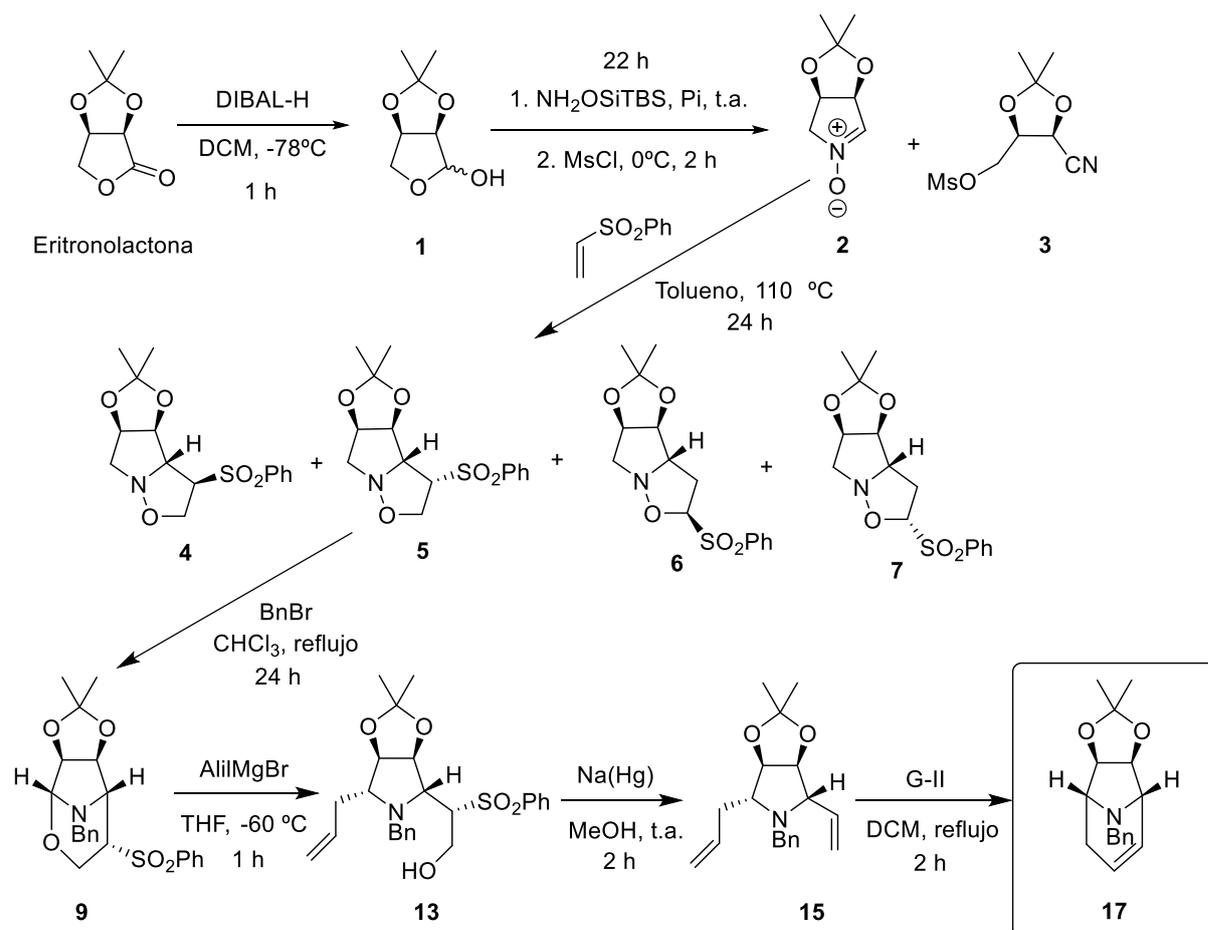
Como objetivos particulares se establecen los siguientes:

- Estudiar la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre la nitrona **2** y la fenilvinilsulfona para la obtención de isoxazolidinas.
- Estudiar el reordenamiento de isoxazolidinas a oxazinas, compuestos análogos de cocaína.
- Obtener pirrolidinas C-ramificadas a partir de oxazinas.
- Obtener análogos de calisteginas por reacción de metátesis de pirrolidinas C-ramificadas.
- Establecer la toxicidad “*in vivo*” de los análogos de cocaína utilizando como modelo embriones del pez cebra (*Danio rerio*).

## 4. Discusión de resultados

### 4.1. Síntesis química

Como se ha indicado en los objetivos, el fin del trabajo es la síntesis de análogos de calisteginas. A continuación se muestra un esquema general de la ruta seguida para la obtención del compuesto final **17** a partir de (-)-2,3-O-isopropiliden-D-eritronolactona:

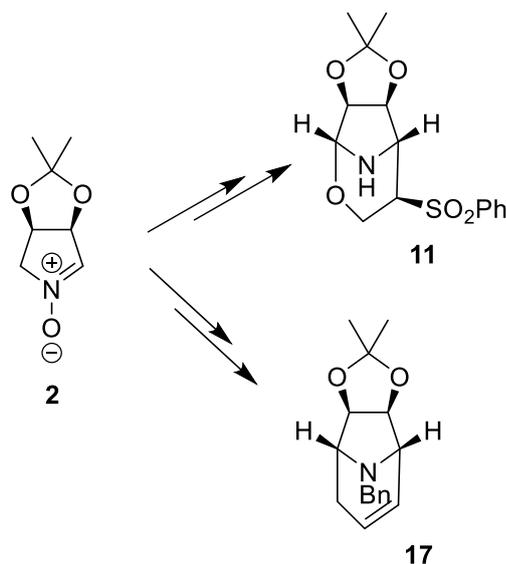


Esquema 2. Esquema general de la síntesis del análogo de calistegina **17**

Para lograr el objetivo, se utiliza una nitrona como material de partida. Las nitronas son “herramientas” sintéticas de gran utilidad en Química Orgánica, especialmente en la síntesis de alcaloides. Han sido empleadas con éxito en reacciones de cicloadición 1,3-dipolares, como en este caso. Además, se trata de compuestos muy estables, que no es necesario generar *in situ* sino que pueden ser almacenados. Todo

ello hace que las nitronas sean materiales de partida ideales para la obtención de manera estereoselectiva de heterociclos nitrogenados.<sup>15</sup>

Se ha seleccionado como material de partida la nitrona **2** para la síntesis de compuestos análogos de cocaína como **11** y análogos de calisteginas como **17** (Figura 10).



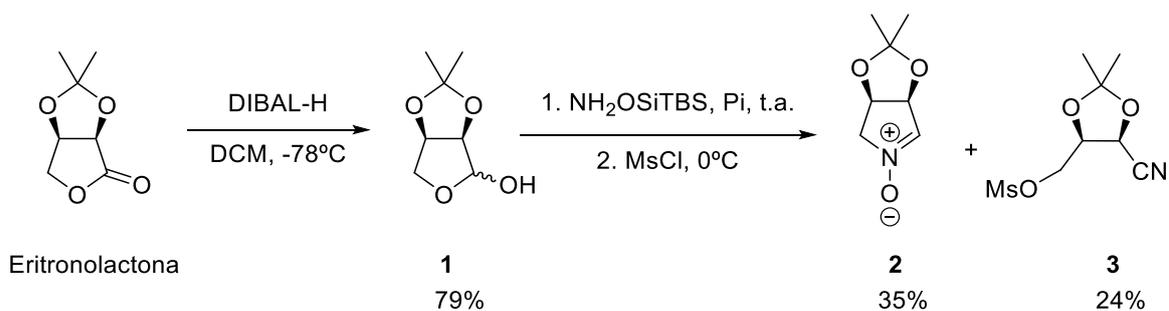
**Figura 10.** Nitrona **2**, como producto de partida para la obtención de análogos de cocaína y calisteginas.

A continuación se comentan los siguientes apartados que conducirán a la síntesis de los compuestos objetivo.

#### 4.1.1. Síntesis de la nitrona de partida **2**

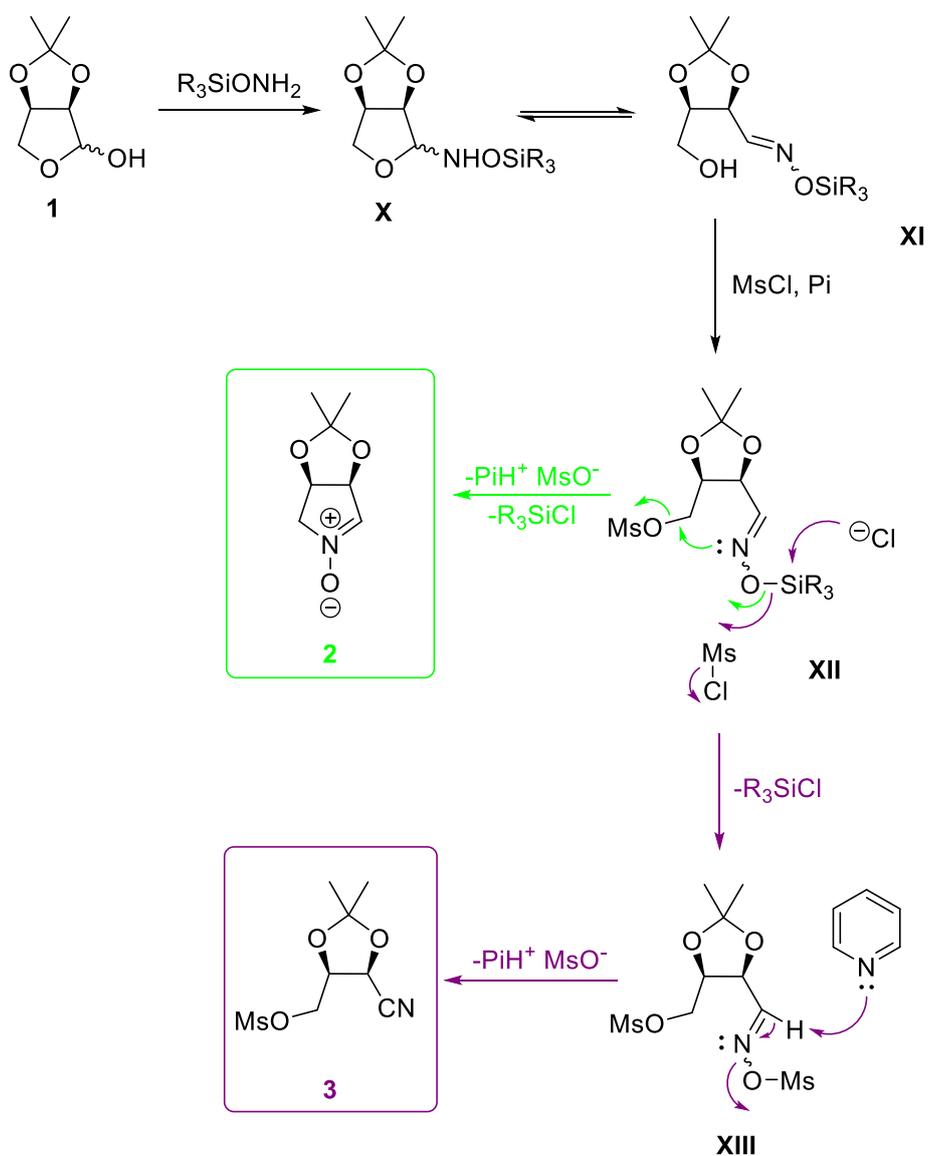
La nitrona **2** se sintetiza mediante una estrategia empleada anteriormente por el grupo de investigación de Química Orgánica.<sup>14</sup> En primer lugar, la (-)-2,3-O-isopropiliden-D-eritronolactona, compuesto comercial y barato, se reduce con DIBAL-H a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , obteniéndose el lactol **1**. El tratamiento del lactol **1** con *tert*-butildimetilsililhidroxilamina en piridina y la posterior adición de MsCl conducen a la formación de la nitrona **2**, con un 35% de rendimiento. Adicionalmente, se puede aislar el nitrilo **3** como producto secundario de la reacción en un 24% (Esquema 3).

Discusión de resultados



Esquema 3. Síntesis de nitrona 2

En el siguiente esquema se indica el mecanismo de formación de la nitrona **2** y el nitrilo **3**:<sup>16</sup>



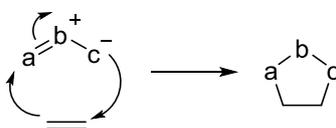
Esquema 4. Mecanismo de formación de la nitrona **2** y nitrilo **3**.

Inicialmente, se forma una *N*-glicosil hidroxilamina (**X**) que sufre una *O*-mesilación a través de su tautómero acíclico para formar la oxima *O*-sililada (**XI**). Como se muestra en el proceso representado en verde, el cloruro promueve *in situ* la desililación de **XII** y el anión oximato generado desplaza al mesilo mediante una reacción S<sub>N</sub>1 para dar la nitrona **2**. Por otra parte, como muestra el mecanismo representado en morado, el exceso de MsCl conduce a la obtención del nitrilo **3** como producto secundario a través del intermedio **XIII** (**Esquema 4**).

Pese a que el rendimiento de esta reacción es moderado, este método presenta la ventaja de que se realiza en un solo paso y solo se obtiene un enantiómero.

#### 4.1.2. Reacción 1,3-dipolar de la nitrona **2** con la fenilvinilsulfona

Las cicloadiciones 1,3-dipolares o cicloadiciones [3+2] son un tipo de cicloadiciones en las cuales dos enlaces sigma se forman de una manera concertada, aunque no simultánea. En este tipo de reacciones, un 1,3-dipolo reacciona con un alqueno dipolarófilo para dar un anillo de cinco miembros como se observa en la **Figura 11**:

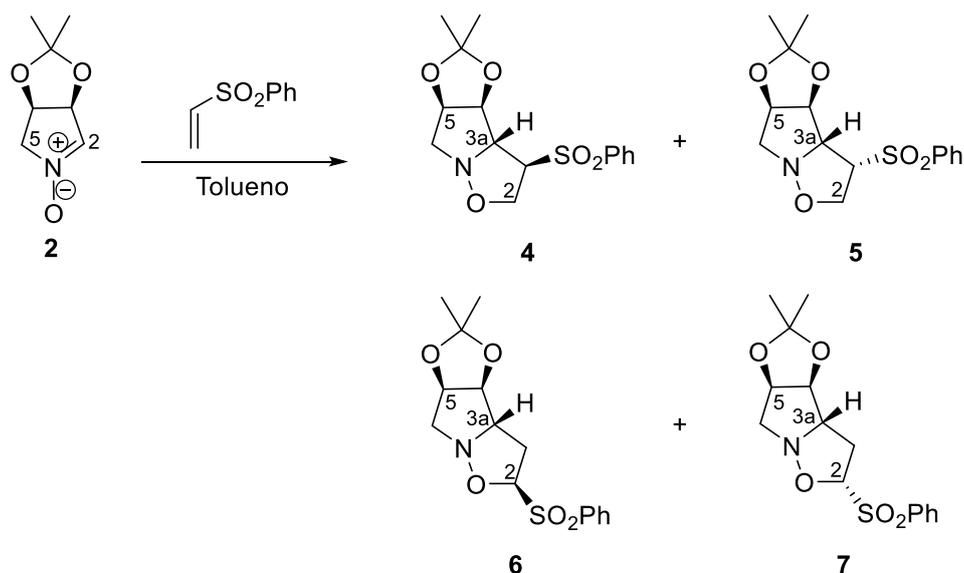


**Figura 11.** Cicloadición 1,3-dipolar

Las nitronas son 1,3-dipolos muy útiles en la construcción de heterociclos nitrogenados, permitiendo la obtención de isoxazolidinas de una manera sencilla. Especialmente importantes son las nitronas cíclicas, que se han utilizado para la síntesis de muchos productos naturales bioactivos.<sup>17</sup>

La cicloadición intermolecular de nitronas con alquenos ha sido extensamente estudiada. Sin embargo, la correspondiente reacción de nitronas con sulfonas ha recibido menos atención. En cuanto a las sulfonas, la facilidad para su eliminación ha hecho que se incremente su importancia en la química sintética.<sup>18</sup> En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de la nitrona **2** con una sulfona disponible comercialmente como es la fenilvinilsulfona (**Esquema 5**).

Discusión de resultados



**Esquema 5.** Cicloadición 1,3-dipolar de la nitrona **2** con la fenilvinilsulfona

Se ha realizado la reacción empleando diferentes condiciones, como se muestra en la siguiente tabla:

Entrada	Disolvente	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)	Relación %			
					4	5	6	7
1	Tolueno	6	t.a.	60	38	38	12	12
2	Tolueno	22	85 °C	89	23	47	18	12
3	<b>Tolueno</b>	<b>24</b>	<b>110 °C</b>	<b>99</b>	<b>44</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>35</b>

**Tabla 1.** Optimización de condiciones para la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de la nitrona **2** y la fenilvinilsulfona

Se observa que en todos los casos se generan cuatro isoxazolidinas que son separadas mediante cromatografía en columna. La caracterización de los compuestos se llevó a cabo en un estudio anterior realizado por el grupo de investigación mediante RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , por lo que la asignación de las señales para su identificación se resuelve de forma sencilla.<sup>14</sup>

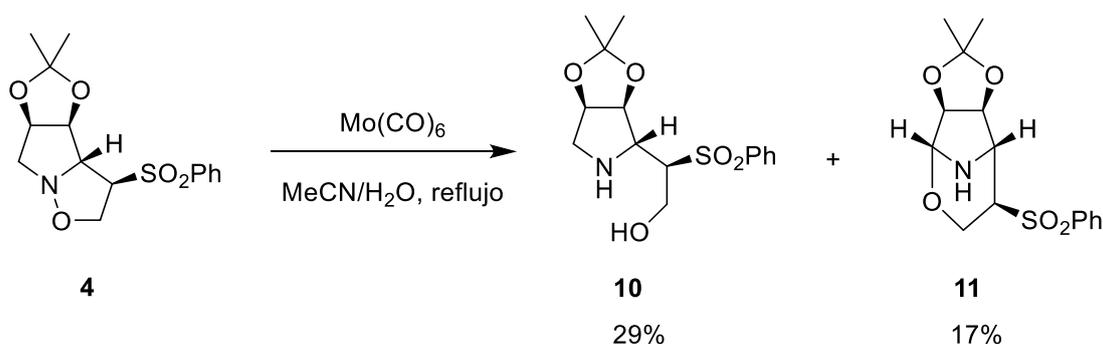
La estereoquímica de la adición ocurre en *anti* con respecto al grupo acetónido, es decir, la fenilvinilsulfona entra por la cara opuesta al acetónido de manera que el hidrógeno de la posición 3a (**Esquema 5**) siempre queda en la misma orientación que éste. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten establecer una tendencia



Este reordenamiento se puede entender como una migración 1,3-hidruro (del C-H en la posición 6 de la isoxazolidina **5**) al oxígeno de la isoxazolidina (Camino A, **Esquema 7**). También se puede considerar una apertura del anillo por desprotonación (Camino B, **Esquema 7**). Dado que la formación de las oxazinas **8** y **9** ocurre en condiciones térmicas y sin añadir otro reactivo, se puede suponer que la hipótesis de la migración 1,3-hidruro es correcta.<sup>18</sup>

#### 4.1.4. Ruptura del enlace N-O de la isoxazolidina **4**

La apertura de la isoxazolidina **4** se realiza rompiendo el enlace N-O mediante tratamiento con Mo(CO)<sub>6</sub> en MeCN/H<sub>2</sub>O,<sup>19</sup> obteniéndose la pirrolidina **10** (**Esquema 8**). Además se observa la formación de la oxazina **11**. Aunque los dos compuestos se obtienen con rendimientos bajos, es un método rápido y eficaz para la obtención de **11**.



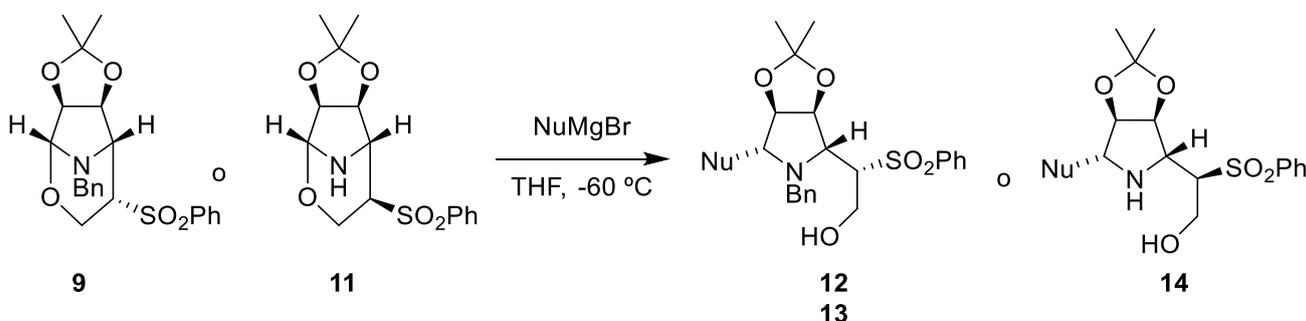
*Esquema 8. Tratamiento de **4** con Mo(CO)<sub>6</sub>*

La reducción ocurre sin cambio en la estereoquímica de los centros quirales del anillo isoxazolidina. El mecanismo de la reducción de isoxazolidinas, sugerido por Nitta et al.,<sup>20</sup> considera la retro-donación  $\pi$  del orbital d lleno del molibdeno al  $\pi^*$  (LUMO) de la isoxazolidina, lo cual debería facilitar la ruptura del enlace N-O.

#### 4.1.5. Apertura de oxazinas con nucleófilos

Una vez sintetizados los análogos de cocaína, se seleccionan dos de estos compuestos (**9** y **11**) para la obtención de las pirrolidinas **12**, **13** y **14**, potencialmente bioactivas, y siendo **13** y **14** excelentes materiales de partida para la obtención del esqueleto de las calisteginas. La formación de las pirrolidinas se lleva a cabo mediante la adición estereoselectiva de reactivos de Grignard (**Esquema 9**). Los nucleófilos utilizados son el bromuro de metilmagnesio y el bromuro de alilmagnesio, cuya adición

ha sido estudiada anteriormente,<sup>14</sup> obteniéndose buenos rendimientos. En dicho estudio se demuestra que la configuración del grupo sulfona no influye en la estereoquímica de la reacción. Por tanto, la adición ocurre por la cara opuesta al nitrógeno independientemente de que el material de partida sea **9** o **11**.



Esquema 9. Apertura de oxazinas

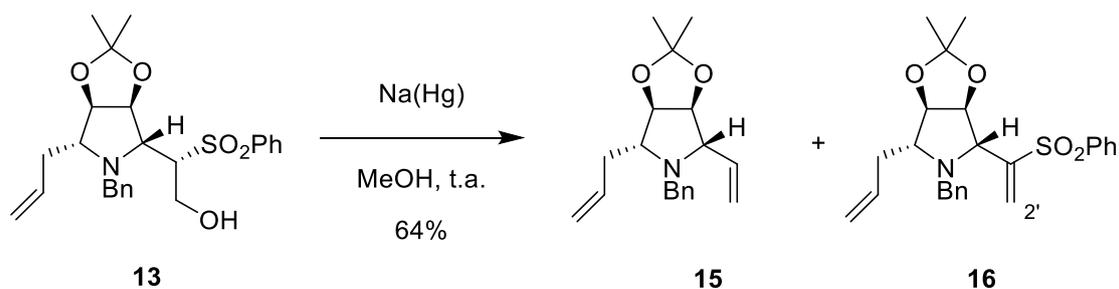
Entrada	Oxazina	Nucleófilo	Producto	Rendimiento (%)
1	9	MeMgBr	12, Nu=Me	70
2	9	AlilMgBr	13, Nu=Alil	85
3	11	AlilMgBr	14, Nu=Alil	40

Tabla 2. Adición de nucleófilos para la apertura de oxazinas

Mediante la adición de nucleófilos para la apertura de las oxazinas, se obtienen las pirrolidinas **12**, **13** con buen rendimiento y **14** con rendimiento moderado (Tabla 2).

#### 4.1.6. Reacción de desulfonación reductora de la pirrolidina 13

Dado que la obtención de análogos de calisteginas se plantea mediante un cierre de anillo por metátesis, es necesario disponer de dos olefinas para lograrlo. Con el fin de obtener el compuesto **15**, precursor de análogos de calistegina, la pirrolidina **13** se trata con amalgama de Na(Hg) al 5% en MeOH (Esquema 10).<sup>18</sup> Mediante el espectro de RMN <sup>1</sup>H se observa que, además de la pirrolidina **15** deseada, se forma el compuesto **16**, ya que aparecen las señales correspondientes al grupo fenilo de la sulfona (doblete a 7.90 ppm y multiplete a 7.57 ppm) y a los hidrógenos del doble enlace de C-2' (singuletes a 6.53 y 6.28 ppm). Se obtiene un rendimiento global moderado. Debido a la pequeña cantidad de producto obtenida, se decide no separar los compuestos.

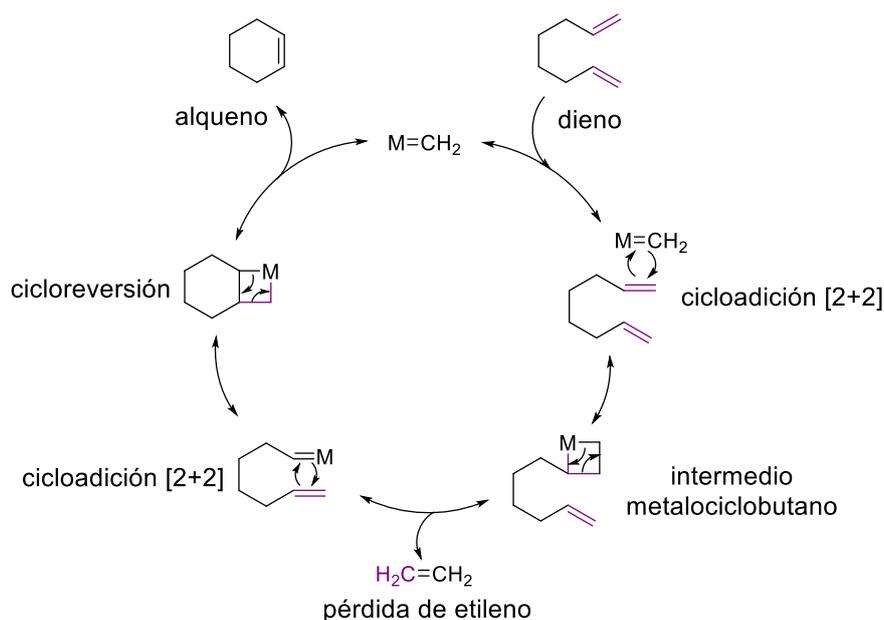


**Esquema 10.** Tratamiento de **13** con Na(Hg) en MeOH

#### 4.1.7. Reacción de metátesis

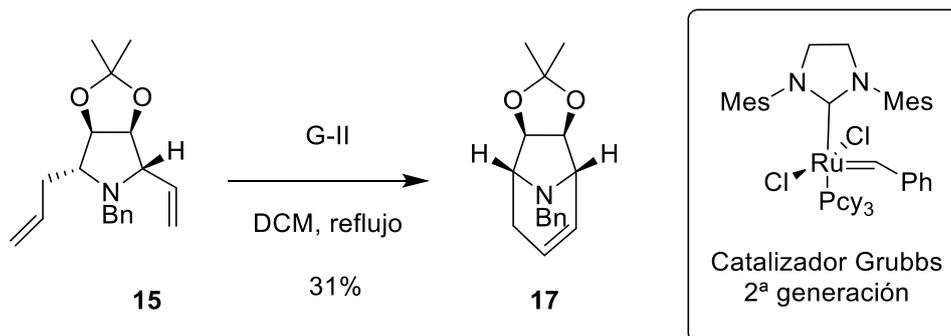
La metátesis de olefinas se descubrió por accidente como consecuencia del estudio de polimerización con catalizadores de Ziegler-Natta. Desde entonces la metátesis se ha convertido en una de las herramientas sintéticas más poderosas en síntesis orgánica. Esto se debe a la disponibilidad de catalizadores estables, como los catalizadores de Grubbs de primera y segunda generación, el catalizador de Hoveyda, etc. y a su gran nivel de tolerancia de grupos funcionales. Dentro de las posibles aplicaciones de la metátesis, la reacción de metátesis de cierre de anillo (RCM) se ha utilizado ampliamente para la síntesis de varios iminoazúcares monocíclicos y bicíclicos.<sup>10,21</sup>

La metátesis de cierre de anillo consiste en el acoplamiento intramolecular de dos unidades de alqueno, obteniéndose una olefina cíclica y etileno gaseoso. La formación del etileno es la fuerza motriz de la reacción, por lo cual su reversibilidad puede modularse eliminando el etileno de la mezcla de reacción (**Esquema 11**).<sup>22</sup>



**Esquema 11.** Mecanismo de la metátesis de cierre de anillo

Para la reacción de metátesis de **15** se emplea un catalizador de Grubbs de segunda generación, ya que éste se ha utilizado anteriormente en el grupo de investigación de Química Orgánica.<sup>14</sup> La mezcla de **15** y **16**, en presencia del catalizador, da lugar a la formación del análogo de calistegina **17**, con un rendimiento del 31% (**Esquema 12**) Dado que el compuesto **16** no reacciona, fue necesaria su separación del producto final **17** mediante cromatografía en columna.

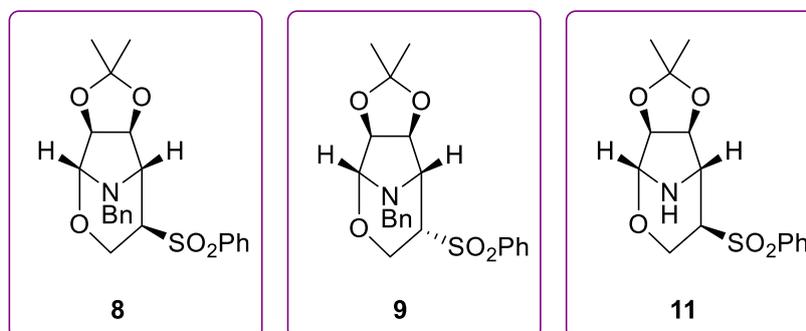


**Esquema 12.** Metátesis de cierre de anillo de la pirrolidina **12**

De esta manera se ha planteado una nueva metodología para la obtención de análogos de calisteginas, que se llevará a cabo a mayor escala en un futuro cercano.

#### 4.2. Estudio toxicológico

Se ha realizado el estudio toxicológico en embriones del pez cebra de los análogos de cocaína **8**, **9** y **11**, sintetizados anteriormente (**Figura 12**). El interés del estudio radica en el conocimiento de la viabilidad de los compuestos, en términos de toxicidad, para su posible aplicación terapéutica.



**Figura 12.** Análogos de cocaína **8**, **9** y **11**

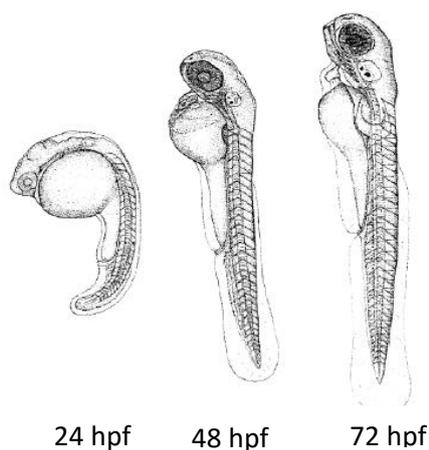
Por una parte, se ha llevado a cabo el estudio toxicológico durante el desarrollo embrionario, y se han analizado diferentes parámetros a las 24, 48 y 72 hpf (horas post-fecundación). Por otra parte, se está a la espera de los resultados de las medidas de HPLC de los sobrenadantes, enviados al Servicio General de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca, para el cálculo de la degradación e incorporación de los análogos de cocaína.

#### **4.2.1. Estudio toxicológico de la mortalidad y malformaciones**

El estudio toxicológico consiste en el análisis de las alteraciones morfológicas observadas en embriones tratados con diferentes dosis de cada compuesto a las 24, 48 y 72 hpf. Se han establecido los siguientes parámetros:

- Muerte o coagulación de los embriones.
- Malformaciones del embrión: retraso del crecimiento y/o desarrollo (determinando el número de horas de retraso), alteraciones cardíacas en la morfología y en el latido, en la pigmentación, en la morfología del eje anteroposterior, en el sistema nervioso central, etc.

Para el estudio de las malformaciones hay que tener en cuenta los diferentes estadios evolutivos del pez cebra.<sup>23</sup> En la siguiente figura se observa el desarrollo normal del embrión del pez cebra a las 24, 48 y 72 hpf:

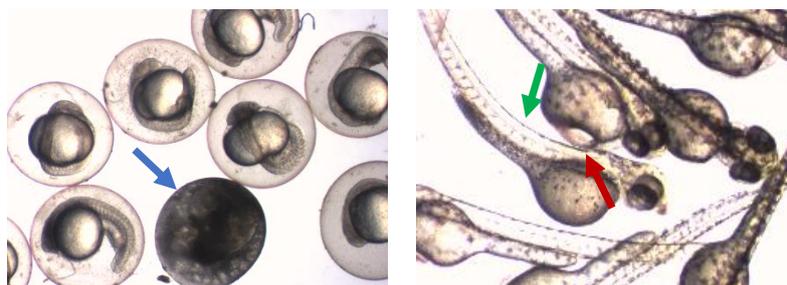


**Figura 13.** Desarrollo normal del embrión del pez cebra a las 24, 48 y 72 hpf<sup>23</sup>

Los estudios toxicológicos se reproducen tres veces en las mismas condiciones, descritas en el apartado de metodología. Los resultados obtenidos, tanto para la

mortalidad como para las malformaciones, se encuentran recogidos en las **Tablas 3-11** del **Anexo I**.

Además, se toman imágenes representativas de los embriones mediante una cámara acoplada al estereomicroscopio (**Tablas 16, 17 y 18, Anexo II**). A continuación, se muestran imágenes representativas de la mortalidad y las malformaciones (**Figura 14**). En la imagen de la izquierda se aprecia un embrión coagulado (flecha azul) a las 24 hpf y en la imagen de la derecha se observa un embrión con un gran edema pericárdico (flecha roja) y otro con el eje del cuerpo torcido (flecha verde) a las 72 hpf.



**Figura 14.** Embrión coagulado a las 24 hpf (izquierda) y malformaciones a las 72 hpf (derecha)

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico de la mortalidad (**Anexo I**) indican que existen diferencias significativas entre la dosis de 150  $\mu\text{M}$  y los controles a las 48 hpf y 72 hpf para los tres compuestos. No se observan diferencias estadísticamente significativas para dosis inferiores, por lo que se puede establecer que la dosis más alta (150  $\mu\text{M}$ ) es la dosis letal mínima para los tres compuestos (**8, 9 y 11**)

## 5. Metodología

---

Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos objetivo se utilizaron una serie de técnicas instrumentales y métodos de aislamiento que se describen a continuación.

### 5.1. Técnicas generales de síntesis y caracterización

- *Rotaciones específicas o poder rotatorio* ( $[\alpha]_D^{20}$ ): las mediciones se llevaron a cabo en un polarímetro digital Perkin-Elmer 241 en cubetas de 1 dm de paso óptico, a 589 nm y a 20 °C y en disolución de  $\text{CHCl}_3$ . La concentración a la que se realizó la medida se especifica en cada caso.
- *Espectroscopia infrarroja*: las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu IR Affinity-1 de transformada de Fourier en película capilar sobre cristales de NaCl.
- *Espectroscopia de resonancia magnética nuclear*: las medidas se realizaron en un espectrómetro VARIAN 200 MHz (200 MHz  $^1\text{H}$  y 50 MHz  $^{13}\text{C}$ ). Se utilizó  $\text{CDCl}_3$  como disolvente y se referenció con respecto al disolvente residual  $\text{CHCl}_3$  (señales a 7.26 ppm para  $^1\text{H}$  y 77.0 ppm para  $^{13}\text{C}$ ). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento  $J$  en Hz. La multiplicidad de los carbonos se determinó utilizando la secuencia de pulsos DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer).
- *Cromatografía en capa fina (CCF, TLC)*: se realizaron en placas de 0.2 mm de espesor de gel de sílice Merck (60 F254). Para su revelado se utilizaron disoluciones de ácido fosfomolibdico seguido de calentamiento a 120 °C y de  $\text{KMnO}_4$  al 5%. Además, las sustancias fluorescentes se visualizaron por iluminación con luz ultravioleta de  $\lambda=254$  nm antes de su revelado.
- *Cromatografía en columna (CC)*: se realizó en columna de vidrio llena de una papilla de gel de sílice SDS 60 Å (70-200  $\mu\text{m}$ ) y el eluyente inicial, agitando suavemente para eliminar el aire. La proporción habitual son 20 g de gel de sílice por gramo de producto a purificar. La polaridad del eluyente es creciente y se sigue la composición de las fracciones eluidas por TLC.
- *Espectrometría de masas*: las medidas se llevaron a cabo en un espectrómetro de cuadrupolo-tiempo de vuelo Applied Biosystems QSTAR XL.

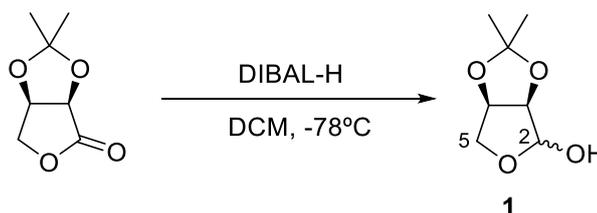
## 5.2. Purificación de reactivos y disolventes

- **Acetonitrilo (MeCN):** destilado sobre CaH<sub>2</sub> y se almacena con tamiz molecular 3 Å.
- **Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>):** se destila.
- **Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** se destila sobre CaH<sub>2</sub> bajo atmósfera de argón.
- **Éter (Et<sub>2</sub>O):** se calienta a ebullición sobre Na y se destila sobre Na y benzofenona.
- **n-Hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>):** se destila y almacena con CaCl<sub>2</sub>.
- **Metanol (MeOH):** se destila.
- **Piridina (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N):** se destila sobre BaO y se almacena con KOH.
- **Tetrahidrofurano (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O):** se calienta a ebullición sobre Na y se destila sobre Na y benzofenona.
- **Tolueno (MeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>):** se destila y se almacena con Na.

## 5.3. Metodología de síntesis

### 5.3.1. Obtención del material de partida 2

#### 5.3.1.1. Reducción de la (-)-2,3-O-Isopropiliden-D-eritronolactona.



Se pesan 2.57 g (16.2 mmol) de (-)-2,3-O-Isopropiliden-D-eritronolactona y se añaden 162 mL de DCM seco. Se deja la disolución agitando a -78 °C bajo atmósfera de argón. Una vez alcanzada la temperatura, se añaden 14.5 mL (25.4 mmol) de una disolución de DIBAL-H al 25% en tolueno y se mantiene la agitación durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se para la reacción añadiendo 5 mL de tartrato sódico y potásico saturado y se deja agitando hasta alcanzar t.a. A continuación, se extrae con DCM, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene el producto **1** (2.03 g, 79%), como un líquido ligeramente amarillo.

### 3,4-O-Isopropeniliden-D-eritronolactol, **1**

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10.5 \text{ (} c = 0.1, \text{CHCl}_3 \text{)}.$$

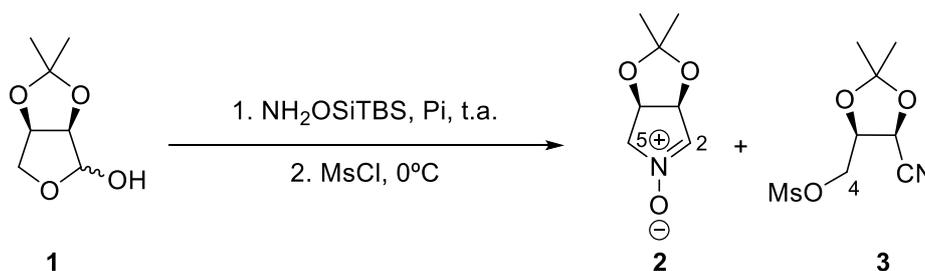
IR  $\nu_{\text{máx}}$  (película) cm<sup>-1</sup>: 3500 (ancha), 2944, 1375, 1211, 1099, 1069, 988.

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.43 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-2), 4.85 (1H, dd,  $J$  = 5.8, 2.0 Hz, m, H-3), 4.59 (1H, d,  $J$  = 5.8 Hz, H-4), 4.06 (1H, dd,  $J$  = 3.2 y 10.6 Hz, H<sub>A</sub>-5), 4.04 (1H, d,  $J$  = 10.6 Hz, H<sub>B</sub>-5), 1.48 (3H, s, Me-acetónido), 1.33 (3H, s, Me-acetónido).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (ppm) (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 112.4 (C-acetónido), 101.6 (CH-2), 85.3 (CH-3), 80.0 (CH-4), 71.7 (CH<sub>2</sub>-5), 26.2 (Me-acetónido), 24.7 (Me-acetónido).

**HRMS**, ESI: Calculado para C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>Na, 183.0627 u. Experimental M+Na, 183.0773  $m/z$ .

5.3.1.2. Síntesis de (3*S*,4*R*)-3,4-Isopropilidendioxi-3,4-dihidro-5*H*-pirrol-1-óxido, **2**.



Sobre una disolución de 2.03 g (12.9 mmol) de lactol **1** en 8 mL de piridina seca con 12 g de tamiz molecular de 3 Å, bajo atmósfera de argón, se añade vía cánula una disolución de 1.13 g (7.6 mmol) de (*t*-Butildimetilsilil)-hidroxilamina en 8 mL de piridina seca. Se deja agitando la reacción durante 22 h, tras las cuales se baja la temperatura a 0 °C y se añaden gota a gota 0.6 mL (7.6 mmol) de MsCl. Se mantiene agitando durante 2 h más a 0 °C y después se deja alcanzar t.a. Después se diluye con DCM, se filtra sobre Celita® y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando DCM:AcOEt:MeOH (15:7:1) como eluyente, aislando la nitrona **2** (710 mg, 35%) como un sólido amarillo pálido en forma de escamas.

**(3*S*,4*R*)-3,4-Isopropilidendioxi-3,4-dihidro-5*H*-pirrol-1-óxido, **2**.**

$[\alpha]_D^{20} = -26.9$  ( $c = 1.1$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**IR**  $\nu_{\text{máx}}$  (película) cm<sup>-1</sup>: 3084, 2993, 2980, 1579.

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.88 (1H, q,  $J$  = 1.5 Hz, H-2), 5.30 (1H, d,  $J$  = 6.2 Hz, H-3), 4.92 (1H, ddd,  $J$  = 1.5, 5.1 y 6.2 Hz, H-4), 4.22-3.98 (2H, m, H-5), 1.47 (3H, s, Me-acetónido), 1.38 (3H, s, Me-acetónido).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (ppm) (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 132.8 (CH-2), 112.3 (C-acetónido), 80.0 (CH-3), 73.8 (CH-4), 68.1 (CH<sub>2</sub>-5), 27.4 (Me-acetónido), 25.9 (Me-acetónido).

**HRMS**, ESI: Calculado para  $C_7H_{12}NO_3$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 158.0739 u. Experimental ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 158.0822  $m/z$ .

### 2,3-O-Isopropiliden-4-O-metilsulfonil-D-eritronitrilo, **3**.

$[\alpha]_D^{20} = -50.4$  ( $c=1.1$ ,  $CHCl_3$ ).

**IR**  $\nu_{\text{máx}}$  (película)  $cm^{-1}$ : 3024.38, 2941.44, 1355.96, 1178.51, 970.19, 862.18.

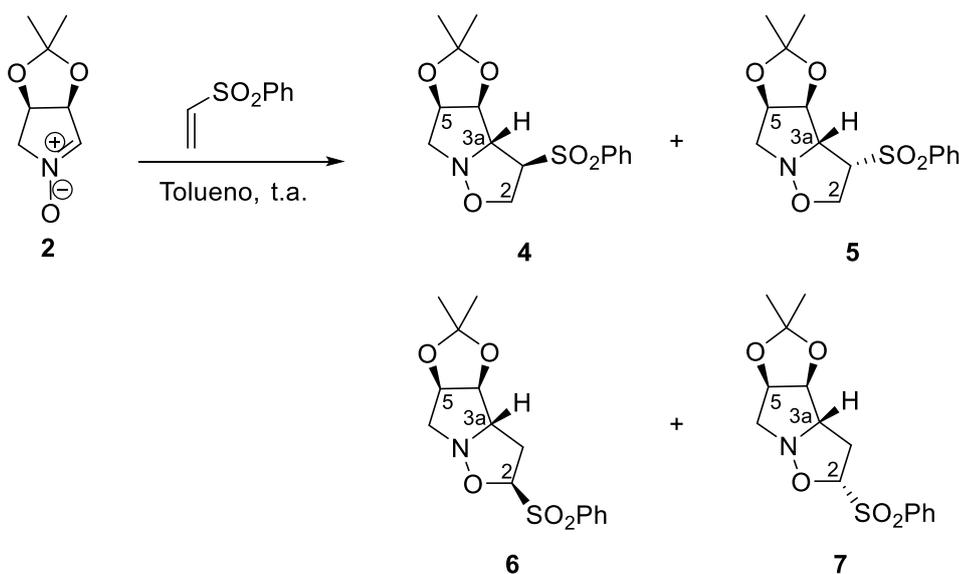
**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm) (200 MHz,  $CDCl_3$ ): 5.00 (1H, d,  $J = 5$  Hz, H-2), 4.50-4.38 (3H, m, H-3 y  $CH_2$ -4), 3.10 (3H, s,  $SO_2Me$ ), 1.57 (3H, s, Me-acetónido), 1.40 (3H, s, Me-acetónido).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (ppm) (50 MHz,  $CDCl_3$ ): 113.8 (C-acetónido), 100.0 (C-1), 74.6 (CH-2), 67.3 ( $CH_2$ -4), 66.4 (CH-3), 37.8 ( $CH_3-SO_2Me$ ), 27.1 (Me-acetónido), 25.9 (Me-acetónido).

**HRMS**, ESI: Calculado para  $C_8H_{13}NO_5NaS$ , 258.0406 u. Experimental  $M+Na$ , 258.0407  $m/z$ .

## 5.3.2. Formación isoxazolidinas a partir de la nitrona **2**

### 5.3.2.1. Síntesis de isoxazolidinas en tolueno a temperatura ambiente



Sobre una disolución de 124.4 mg de la nitrona **2** (0.79 mmol) en 2.7 mL de tolueno, se añaden 166.4 mg de  $C_2H_3SO_2Ph$  (1.00 mmol), bajo atmósfera de argón. La mezcla se mantiene en agitación durante 6 h a t.a. La reacción se para adicionando unas gotas de una disolución saturada de  $NH_4Cl$  y se extrae con  $AcOEt$ . La fase orgánica se lava con disolución saturada de  $NaCl$ , se seca sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel

de sílice, utilizando Hexano:AcOEt (6:4) como eluyente, aislándose las isoxazolidinas **4**, **5**, **6** y **7** como sólidos blancos con un 60% rendimiento global.

**(3R,3aR,4S,5R)-3-Fenilsulfonil-4,5-isopropilidendioxi-hexahidropirrolo[1,2-*b*]isoxazol, 4.**

pf: 125 °C.

$[\alpha]_D^{20} = +11.2$  (c= 0.7, CHCl<sub>3</sub>).

IR  $\nu_{\text{máx}}$  (película) cm<sup>-1</sup>: 3440, 2983, 2925.

<sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.96 (2H, d, *J*= 8.0 Hz, H-orto), 7.71 (1H, t, *J*= 7.4 Hz, H-para), 7.63 (2H, t, *J*= 7.2 Hz, H-meta), 4.84 (1H, dt, *J*= 2.8 y 6.2 Hz, H-5), 4.50 (1H, dd, *J*= 1.8 y 6.2 Hz, H-4), 4.20 (2H, d, *J*= 7.6 Hz, CH<sub>2</sub>-2), 4.05 (1H, dd, *J*= 1.8 y 5.6 Hz, H-3a), 3.91 (1H, dd, *J*= 5.4 y 7.6 Hz, H-3), 3.33 (1H, dd, *J*= 2.8 y 13.2 Hz, H<sub>B</sub>-6), 3.17 (1H, dd, *J*= 6.2 y 13.2 Hz, H<sub>A</sub>-6), 1.47 (3H, s, Me-acetónido), 1.25 (3H, s, Me-acetónido).

<sup>13</sup>C RMN  $\delta$  (ppm) (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 137.5 (C-*ipso*), 134.4 (CH-*para*), 129.6 (2CH-*meta*), 128.7 (2CH-*orto*), 113.1 (C-acetónido), 83.5 (CH-4), 79.6 (CH-5), 72.6 (CH-3a), 70.3 (CH-3), 66.1 (CH<sub>2</sub>-2), 59.2 (CH<sub>2</sub>-6), 26.4 (Me-acetónido), 24.8 (Me-acetónido).

HRMS, ESI: Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>NaS, 348.0876 u. Experimental M+ Na, 348.0868 *m/z*.

**(3S,3aR,4S,5R)-3-Fenilsulfonil-4,5-isopropilidendioxi-hexahidropirrolo[1,2-*b*]isoxazol, 5.**

pf: 114 °C.

$[\alpha]_D^{20} = +22.5$  (c= 1.4, CHCl<sub>3</sub>).

IR  $\nu_{\text{máx}}$  (película) cm<sup>-1</sup>: 3457, 2987, 2921, 1315, 1156.

<sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.96 (2H, d, *J*= 8.2 Hz, H-orto), 7.70 (1H, t, *J*= 7.6 Hz, H-para), 7.60 (2H, t, *J*= 7.4 Hz, H-meta), 5.64 (1H, dd, *J*= 2.6 y 6.6 Hz, H-4), 5.02 (1H, ddd, *J*= 3.0, 5.6 y 6.6 Hz, H-5), 4.29 (1H, t, *J*= 8.7 Hz, H-3), 4.21 (1H, t, *J*= 8.7 Hz, H<sub>A</sub>-2), 3.91 (1H, dd, *J*= 2.6 y 8.7 Hz, H-3a), 3.89 (1H, dd, *J*= 8.7 Hz, H<sub>B</sub>-2), 3.44 (1H, dd, *J*= 5.6 y 13.2 Hz, H<sub>A</sub>-6), 3.30 (1H, dd, *J*= 3.0 y 13.2 Hz, H<sub>B</sub>-6), 1.50 (3H, s, Me-acetónido), 1.37 (3H, s, Me-acetónido).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (ppm) (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 137.5 (*C-ipso*), 134.4 (*CH-para*), 129.6 (2*CH-meta*), 128.7 (2*CH-orto*), 113.1 (*C-acetónido*), 83.5 (*CH-4*), 79.6 (*CH-5*), 72.6 (*CH-3a*), 70.3 (*CH-3*), 66.1 (*CH<sub>2</sub>-2*), 59.2 (*CH<sub>2</sub>-6*), 26.4 (*Me-acetónido*), 24.8 (*Me-acetónido*).

**HRMS**, ESI: Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>NaS, 348.0876 u. Experimental M+ Na, 348.0868 *m/z*.

**(2*R*,3*aS*,4*S*,5*R*)-2-Fenilsulfonil-4,5-isopropilidendioxi-hexahidropirrolol[1,2- *b*]isoxazol, 6**

**pf:** 178 °C.

$[\alpha]_D^{20} = +155.0$  (*c* = 0.9, CHCl<sub>3</sub>).

**IR**  $\nu_{\text{máx}}$  (película) cm<sup>-1</sup>: 3379, 2987, 2905, 1438, 1389, 1299.

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.97 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, *H-orto*), 7.64 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, *H-para*), 7.62 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, *H-meta*), 5.02 (1H, dd, *J* = 3.8 y 8.8 Hz, *H-2*), 4.84-4.86 (1H, m, *H-5*), 4.55 (1H, dd, *J* = 2.6 y 6.2 Hz, *H-4*), 3.85 (1H, ddd, *J* = 2.6, 5.8 y 7.6 Hz, *H-3a*), 3.38 (1H, dd, *J* = 3.6 y 13.8 Hz, *H<sub>A</sub>-6*), 3.31 (1H, dd, *J* = 5.6 y 13.8 Hz, *H<sub>B</sub>-6*), 3.22 (1H, ddd, *J* = 3.8, 7.6 y 13.6 Hz, *H<sub>B</sub>-3*), 2.60 (1H, ddd, *J* = 5.8, 8.8 y 13.6 Hz, *H<sub>A</sub>-3*), 1.48 (3H, s, *Me-acetónido*), 1.28 (3H, s, *Me-acetónido*).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (ppm) (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 136.0 (*C-ipso*), 134.2 (*CH-para*), 129.1 (2*CH-meta*), 129.0 (2*CH-orto*), 113.4 (*C-acetónido*), 92.0 (*CH-2*), 83.9 (*CH-4*), 80.3 (*CH-5*), 70.9 (*CH-3a*), 61.5 (*CH<sub>2</sub>-6*), 33.6 (*CH<sub>2</sub>-3*), 26.7 (*Me-acetónido*), 24.8 (*Me-acetónido*).

**HRMS**, ESI: Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>NaS, 348.0876 u. Experimental M+ Na, 348.0868 *m/z*.

**(2*S*,3*aS*,4*S*,5*R*)-2-Fenilsulfonil-4,5-isopropilidendioxi-hexahidropirrolol[1,2- *b*]isoxazol, 7**

**pf:** 170 °C.

$[\alpha]_D^{20} = -130.5$  (*c* = 1.7, CHCl<sub>3</sub>).

**IR**  $\nu_{\text{máx}}$  (película) cm<sup>-1</sup>: 3475. 2935. 1310. 1149. 1067.

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (ppm) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.97 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, *H-orto*), 7.64 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, *H-para*), 7.62 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, *H-meta*), 4.99 (1H, ddd, *J* = 2.6, 5.6 y 6.6 Hz, *H-5*), 4.95 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, *H-2*), 4.74 (1H, dd, *J* = 1.8 y 6.6 Hz, *H-4*), 3.92 (1H, dt, *J* = 7.4 y 1.8 Hz, *H-3a*), 3.70 (1H, dd, *J* = 5.6 y 13.2 Hz, *H<sub>A</sub>-6*), 3.45 (1H, dd, *J* = 2.6 y 13.2 Hz, *H<sub>B</sub>-6*), 2.88 (1H, ddd,

## Metodología

$J = 7.9, 8.0$  y  $15.0$  Hz,  $H_A-3$ ),  $2.80$  (1H, dt,  $J = 13.6$  y  $7.4$  Hz,  $H_B-3$ ),  $1.48$  (3H, s, Me-acetónido),  $1.28$  (3H, s, Me-acetónido).

$^{13}\text{C RMN } \delta$  (ppm) (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $136.8$  (C-*ipso*),  $134.3$  (CH-*para*),  $129.2$  (2CH-*meta*),  $129.1$  (2CH-*orto*),  $112.5$  (C-acetónido),  $94.0$  (CH-2),  $81.9$  (CH-4),  $79.7$  (CH-5),  $71.5$  (CH-3a),  $61.1$  ( $\text{CH}_2-6$ ),  $39.9$  ( $\text{CH}_2-3$ ),  $26.5$  (Me-acetónido),  $24.9$  (Me-acetónido).

**HRMS**, ESI: Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{NaS}$ ,  $348.0876$  u. Experimental  $\text{M}^+ \text{Na}$ ,  $348.0868$   $m/z$ .

### 5.3.2.2. Síntesis de isoxazolidinas en tolueno a $85^\circ\text{C}$

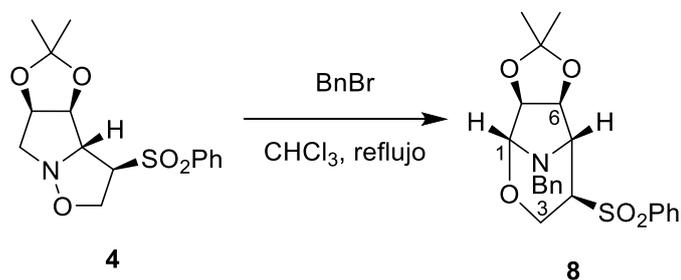
Sobre una disolución de  $867.6$  mg de la nitrona **2** ( $5.52$  mmol) en  $19$  mL de tolueno, se añaden  $1.15$  g de  $\text{C}_2\text{H}_3\text{SO}_2\text{Ph}$  ( $6.90$  mmol), bajo atmósfera de argón. La mezcla se mantiene en agitación durante  $22$  h a  $85^\circ\text{C}$ . La reacción se para adicionando unas gotas de una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrae con  $\text{AcOEt}$ . La fase orgánica se lava con disolución saturada de  $\text{NaCl}$ , se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando Hexano: $\text{AcOEt}$  (6:4) como eluyente, aislándose las isoxazolidinas **4**, **5**, **6** y **7** como sólidos blancos con un  $89\%$  rendimiento global.

### 5.3.2.3. Síntesis de isoxazolidinas en tolueno a reflujo

Sobre una disolución de  $636.6$  mg de la nitrona **2** ( $4.05$  mmol) en  $14$  mL de tolueno, se añaden  $851.7$  mg de  $\text{C}_2\text{H}_3\text{SO}_2\text{Ph}$  ( $5.12$  mmol), bajo atmósfera de argón. La mezcla se mantiene en agitación durante  $24$  h a reflujo de tolueno. La reacción se para adicionando unas gotas de una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrae con  $\text{AcOEt}$ . La fase orgánica se lava con disolución saturada de  $\text{NaCl}$ , se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando Hexano: $\text{AcOEt}$  (6:4) como eluyente, aislándose las isoxazolidinas **4**, **5**, **6** y **7** como sólidos blancos con un  $99\%$  rendimiento global.

### 5.3.3. Reacciones de las isoxazolidinas con BnBr

#### 5.3.3.1. Reordenamiento de la isoxazolidina 4



Sobre una disolución de 273.5 mg de la isoxazolidina **4** (0.84 mmol) en 11 mL de  $\text{CHCl}_3$ , se añaden 144.8 mg de BnBr (0.84 mmol), bajo atmósfera de argón. La mezcla se mantiene en agitación durante 24 h a reflujo de  $\text{CHCl}_3$ . La reacción se para adicionando unas gotas de una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrae con  $\text{CHCl}_3$ . La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando Hexano:AcOEt (8:2) como eluyente, aislándose la oxazina **8** (160.0 mg, 46%) como un aceite incoloro.

#### (1*R*,4*R*,5*R*,6*S*,7*S*)-8-Benzil-4-fenilsulfonil-6,7-isopropilidendioxi-2-oxa-8-azabicyclo[3.2.1]octano, **8**

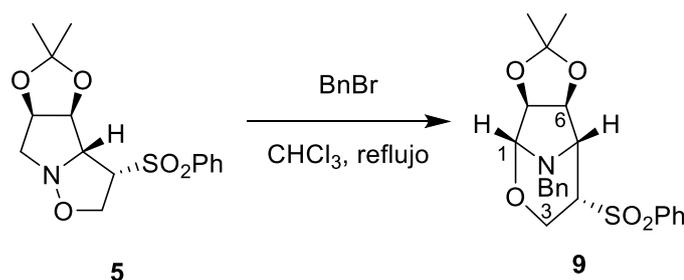
$[\alpha]_D^{20} = -31.7$  ( $c = 0.6$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

IR  $\nu_{\text{máx}}$  (película)  $\text{cm}^{-1}$ : 3391, 3060, 2970, 2921, 1446, 1385, 1152.

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  (ppm) (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.85-7.30 (10H, m, H-Ar), 4.71 (1H, s, H-1), 4.62 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-7), 4.52 (1H, d,  $J = 5.0$  y 1.8 Hz, H-6), 4.38 (1H, d,  $J = 12$  Hz,  $\text{H}_A\text{-CH}_2\text{Bn}$ ), 4.26-4.23 (1H, m,  $\text{H}_A\text{-3}$ ), 4.20 (1H, d,  $J = 12$  Hz,  $\text{H}_B\text{-CH}_2\text{Bn}$ ), 4.13 (1H, s, H-5), 3.85-3.75 (1H, m,  $\text{H}_B\text{-3}$ ), 3.10 (1H, t,  $J = 6.2$  Hz, H-4), 1.52 (3H, s, Me- acetónido), 1.29 (3H, s, Me- acetónido).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  (ppm) (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 138.9 (C-*ipso* $\text{SO}_2\text{Ph}$ ), 138.5 (C-*ipso* $\text{Ph}$ ), 134.4 (CH-*para* $\text{SO}_2\text{Ph}$ ), 129.8 (CH-Ar), 128.7 (CH-Ar), 129.4 (CH-Ar), 127.3 (CH-Ar), 113.3 (C-acetónido), 90.1 (CH-1), 84.6 (CH-6), 83.1 (CH-7), 61.8 (CH-4), 59.6 (CH-5), 58.4 (CH<sub>2</sub>-3), 52.6 (CH<sub>2</sub>Bn), 25.9 (Me-acetónido), 24.8 (Me-acetónido).

HRMS, ESI: Calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_5\text{S}$  (M+H)<sup>+</sup>, 416.1526 u. Experimental (M+H)<sup>+</sup>, 416.1538  $m/z$ .

5.3.3.2. Reordenamiento de la isoxazolidina **5**

Sobre una disolución de 516.0 mg de la isoxazolidina **5** (1.59 mmol) en 21 mL de  $\text{CHCl}_3$ , se añaden 271.9 mg de BnBr (1.59 mmol), bajo atmósfera de argón. La mezcla se mantiene en agitación durante 24 h a reflujo de  $\text{CHCl}_3$ . La reacción se para adicionando unas gotas de una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrae con  $\text{CHCl}_3$ . La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando Hexano:AcOEt (8:2) como eluyente, aislándose la oxazina **9** (441.2 mg, 67%) como un aceite incoloro.

**(1R,4S,5R,6S,7S)-8-Benzil-4-fenilsulfonil-6,7-isopropilidendioxi-2-oxa-8-azabicyclo[3.2.1]octano, 9**

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28.3$  ( $c = 0.7$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

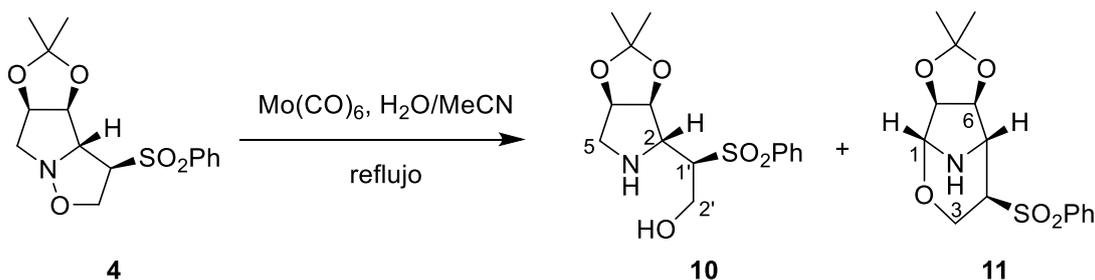
**IR**  $\nu_{\text{máx}}$  (película)  $\text{cm}^{-1}$ : 3387, 2978, 2864, 1589, 1397, 1140.

**$^1\text{H}$  RMN**  $\delta$  (ppm) (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.84–7.52 (10H, m, H-Ar), 5.34 (1H, d,  $J = 5.8$  Hz, H-6), 4.72 (1H, d,  $J = 5.8$  Hz, H-7), 4.50 (1H, s, H-1), 4.14–3.97 (3H, m,  $\text{CH}_2\text{Bn}$  y H- $\text{CH}_2$ -3), 3.84 (1H, t,  $J = 14.8$  Hz, H- $\text{CH}_2$ -3), 3.73 (1H, ddd,  $J = 2.6, 6.2$  y  $8.8$  Hz, H-4), 3.56 (1H, s, H-5), 1.52 (3H, s, Me-acetónido), 1.37 (3H, s, Me-acetónido).

**$^{13}\text{C}$  RMN**  $\delta$  (ppm) (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 138.1 (C-*ipso* $\text{SO}_2\text{Ph}$ ), 137.3 (C-*ipso* $\text{Ph}$ ), 134.4 (CH-*para* $\text{SO}_2\text{Ph}$ ), 129.8 (CH-Ar), 128.7 (CH-Ar), 128.3 (CH-Ar), 127.5 (CH-Ar), 112.5 (C-acetónido), 89.6 (CH-1), 81.4 (CH-7), 77.4 (CH-6), 59.9 (CH-4), 59.8 ( $\text{CH}_2$ -3), 54.1 (CH-5), 48.3 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 26.4 (Me-acetónido), 25.4 (Me-acetónido).

**HRMS**, ESI: Calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NONa}_5\text{S}$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 438.1345 u. Experimental ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 438.1349  $m/z$ .

### 5.3.4. Ruptura del enlace N-O de la isoxazolidina **4** empleando $\text{Mo}(\text{CO})_6$



Sobre una disolución de 149.0 mg (0.46 mmol) de la isoxazolidina **4** en 0.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  / 7 mL de MeCN, se añaden 84.7 mg (0.32 mmol) de  $\text{Mo}(\text{CO})_6$ . La mezcla se mantiene en agitación durante 24 h a reflujo bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando Hexano:AcOEt (8:2) como eluyente, aislándose la pirrolidina **10** (43.0 mg, 29%) y la oxazina **11** como un aceite incoloro (22.7 mg, 17%)

**(1'R,2R,3S,4R)-2-(1'-Fenilsulfonil-2'-hidroxiet-1'-il)-3,4-isopropilidendioxipirrolidina, **10****

pf: 72 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.1$  (c=2.5,  $\text{CHCl}_3$ ).

IR  $\nu_{\text{máx}}$  (película)  $\text{cm}^{-1}$ : 3481, 3334, 2987, 2909, 2840, 1434, 1144, 1042.

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  (ppm) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.91 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-orto), 7.69 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-para), 7.59 (2H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-meta), 5.15 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-3), 4.75 (1H, t,  $J = 4.7$  Hz, H-4), 3.90 (1H, dd,  $J = 3.4$  y 11.8 Hz,  $\text{H}_A\text{-}2'$ ), 3.80 (1H, dd,  $J = 7.7$  y 13.2 Hz,  $\text{H}_B\text{-}2'$ ), 3.69 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-2), 3.15-3.06 (1H, m, H-1'), 3.08 (1H, d,  $J = 13.6$  Hz,  $\text{H}_B\text{-}5$ ), 2.97 (1H, dd,  $J = 13.6$  Hz,  $\text{H}_A\text{-}5$ ), 1.45 (3H, s, Me-acetónido), 1.33 (3H, s, Me acetónido).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  (ppm) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 137.5 (C-*ipso*), 133.2 (CH-*para*), 129.3 (2CH-*meta*), 128.9 (2CH-*orto*), 111.4 (C-acetónido), 84.8 (CH-3), 81.0 (CH-4), 65.4 (CH-2), 63.4 (CH-1'), 61.6 (CH<sub>2</sub>-2'), 51.6 (CH<sub>2</sub>-5), 26.3 (Me-acetónido), 24.1 (Me-acetónido).

HRMS, ESI: Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{S}$  (M+H)<sup>+</sup>, 328.1213 u. Experimental (M+H)<sup>+</sup>, 328.1218  $m/z$ .

**(1*R*,4*R*,5*R*,6*S*,7*S*)-4-Fenilsulfonil-6,7-isopropilidendioxi-2-oxa-8-azabicyclo[3.2.1]octano, 11**

$[\alpha]_D^{20} = -2.7$  ( $c=0.7$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

IR  $\nu_{\text{máx}}$  (película)  $\text{cm}^{-1}$ : 2981.95, 2933.73, 2881.65, 1301.41, 1147.65, 732.95.

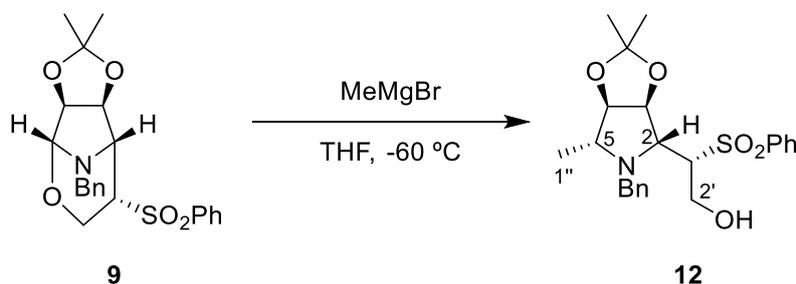
$^1\text{H RMN}$   $\delta$  (ppm) (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.94 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-orto), 7.70–7.56 (3H, m, H-meta y H-para), 4.86 (1H, s, H-1), 4.75 (1H, dd,  $J = 1.2$  y 5.4 Hz, H-6), 4.55–4.48 (2H, m, H-7 y H<sub>B</sub>-3), 3.87 (1H, dd,  $J = 5.8$  y 14.2 Hz, H<sub>A</sub>-3), 3.77 (1H, sa, H-5), 2.73 (1H, dd,  $J = 3.0$  y 5.8 Hz, H-4), 1.45 (3H, s, Me-acetónido), 1.31 (3H, s, Me-acetónido).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  (ppm) (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 137.5 (C-*ipso*), 134.6 (CH-*para*), 129.8 (2CH-*meta*), 128.9 (2CH-*orto*), 112.9 (C-acetónido), 88.8 (CH-1), 81.9 (CH-6), 78.7 (CH-7), 59.1 (CH-4), 57.9 (CH<sub>2</sub>-3), 56.5 (CH-5), 26.1 (Me-acetónido), 24.9 (Me-acetónido).

HRMS, ESI: Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{S}$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 326.1056 u. Experimental ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 326.1027  $m/z$ .

**5.3.4. Apertura de oxazinas con nucleófilos**

5.3.4.1. Apertura de la oxazina **9** con  $\text{MeMgBr}$  a  $-60$  °C



Sobre una disolución de 44.4 mg de la oxazina **9** (0.11 mmol) en 1 mL de THF a  $-60$  °C, se añaden 0.4 mL (1.10 mmol) de una disolución de bromuro de metilmagnesio 3 M en éter, bajo atmósfera de argón. La mezcla se mantiene en agitación durante 2.5 h. A continuación se deja alcanzar t.a. La reacción se para adicionando unas gotas de una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrae con  $\text{AcOEt}$ . La fase orgánica se lava con disolución saturada de  $\text{NaCl}$ , se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando Hexano: $\text{AcOEt}$  (8:2) como eluyente, aislándose la pirrolidina **12** (32.3 mg, 70%) como un aceite incoloro.



**(1'S,2R,3S,4R,5R)-5-Alil-1-benzil-2-(1'-fenilsulfonil-2'-hidroxietil)-3,4-isopropilidendioxipirrolidina, **13****

$[\alpha]_D^{20} = +4.3$  (c=0.5, CHCl<sub>3</sub>).

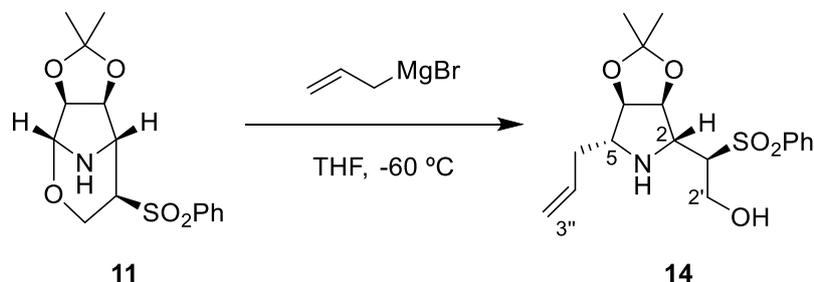
IR  $\nu_{\text{máx}}$  (película) cm<sup>-1</sup>: 3503, 2982, 2916, 2848, 1449, 1150, 1070, 737, 590.

<sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (ppm) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.91-7.24 (10H, m, H-Ar), 5.90-5.76 (1H, m, H-2''), 5.20-5.03 (2H, m, CH<sub>2</sub>-3''), 4.78 (1H, dd, J= 2.0 y 6.2 Hz, H-3), 4.31 (1H, t, J= 6.2 Hz, H-4), 4.09-3.98 (2H, m, CH<sub>2</sub>-2'), 3.91 (1H, d, J= 13.2 Hz, H<sub>A</sub>-CH<sub>2</sub>Bn), 3.58 (1H, sa, H-2), 3.56 (1H, d, J= 13.2 Hz, H<sub>B</sub>-CH<sub>2</sub>Bn), 3.09-2.95 (1H, m, H-1'), 2.48-2.16 (3H, m, H-5, CH<sub>2</sub>-1''), 1.42 (3H, s, Me-acetónido), 1.29 (3H, s, Me-acetónido).

<sup>13</sup>C RMN  $\delta$  (ppm) (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 138.3 (C-*ipso*SO<sub>2</sub>Ph), 136.2 (C-Ar), 134.3-127.3 (CH-Ar), 133.4 (CH-2''), 118.4 (CH<sub>2</sub>-3''), 112.7 (C-acetónido), 82.4 (CH-4), 79.0 (CH-3), 67.6 (CH-2), 65.4 (CH-5), 64.1 (CH-1'), 58.4 (CH<sub>2</sub>-2'), 57.1 (CH<sub>2</sub>Bn), 36.2 (CH<sub>2</sub>-1''), 28.1 (Me-acetónido), 26.0 (Me-acetónido).

HRMS, ESI: Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>S (M+H)<sup>+</sup>, 458.1995 u. Experimental (M+H)<sup>+</sup>, 458.1978 m/z.

5.3.4.3. Apertura de la oxazina **11** con bromuro de alilmagnesio a -60 °C

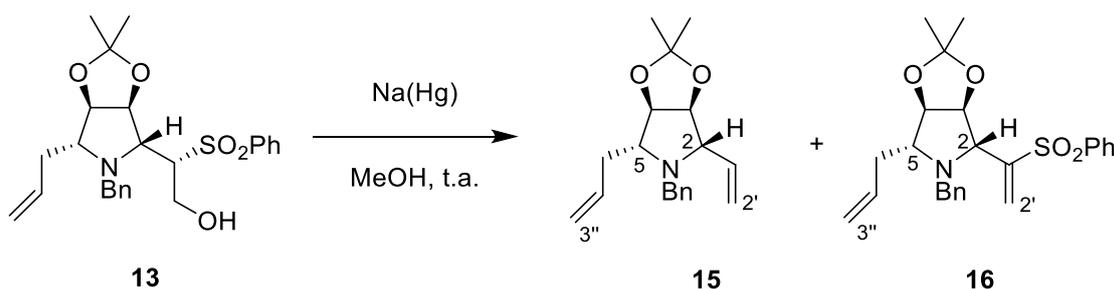


Sobre una disolución de 24.6 mg de la oxazina **11** (0.08 mmol) en 1 mL de THF a -60 °C, se añaden 0.9 mL (0.90 mmol) de una disolución de bromuro de alilmagnesio 1 M en THF, bajo atmósfera de argón. La mezcla se mantiene en agitación durante 2.5 h. A continuación se deja alcanzar t.a. La reacción se para adicionando unas gotas de una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando Hexano:AcOEt (8:2) como eluyente, aislándose la pirrolidina **14** (11.6 mg, 40%) como un aceite incoloro.

**(1'R,2R,3S,4R,5R)-5-Alil-1-benzil-2-(1'-fenilsulfonil-2'-hidroxietil)-3,4-isopropilidendioxipirrolidina, 14**

$^1\text{H RMN } \delta$  (ppm) (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.91 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-orto), 7.60 (3H, m, H-meta y H-para), 5.65 (1H, m, H-2''), 5.30-4.94 (4H, m, H-3, H-4 y H-3''), 4.30-4.17 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -2'), 3.40 (1H, m, H-2), 3.10-3.00 (1H, m, H-1'), 2.2-1.6 (3H, m, H-5 y H-1''), 1.42 (3H, s, Me-acetónido), 1.29 (3H, s, Me-acetónido).

**5.3.5. Reacción de desulfonación de 13**



Sobre una disolución de 17.7 mg del compuesto **11** (0.04 mmol) en 0.6 mL de MeOH y se añade vía cánula sobre 43.0 mg de amalgama de Na(Hg) (0.10 mmol) al 5%. La mezcla se mantiene en agitación durante 2 h, bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, se filtra para eliminar el Hg de la reacción, se evapora el disolvente y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniéndose un rendimiento global del 64%.

**(2S,3S,4R,5R)-5-Alil-1-benzil-2-vinil-3,4-isopropilidendioxipirrolidina, 15**

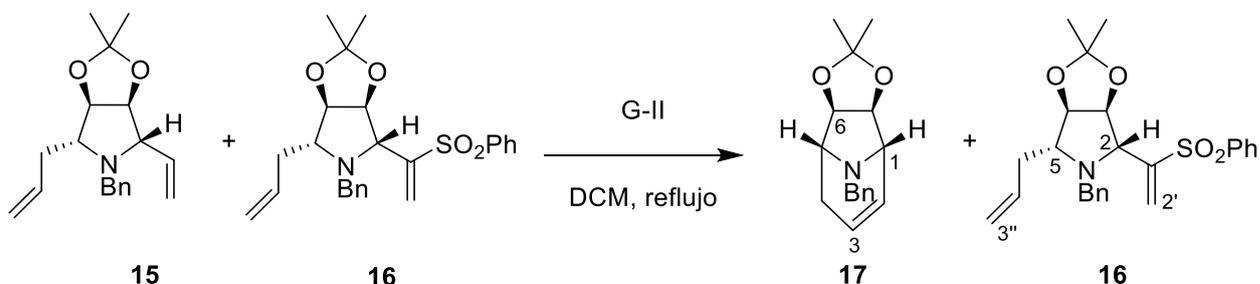
$^1\text{H RMN } \delta$  (ppm) (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.26-7.21 (5H, m, H-Ar), 5.90-5.70 (1H, m, H-2''), 5.82-5.66 (3H, m, H-1' y  $\text{CH}_2$ -1''), 5.39-5.20 (4H, m,  $\text{CH}_2$ -2' y  $\text{CH}_2$ -3''), 4.76 (1H, dd,  $J = 2.0$  y 6.2 Hz, H-3), 4.31 (1H, t,  $J = 6.2$  Hz, H-4), 3.66 (2H, sa,  $\text{CH}_2$ Bn), 3.12 (2H, dd,  $J = 1.8$  y 7.8 Hz, H-2 y H-5), 1.42 (3H, s, Me-acetónido), 1.27 (3H, s, Me-acetónido).

**(2R,3S,4R,5R)-5-Alil-1-benzil-2-(1'-fenilsulfonilvinil)-3,4-isopropilidendioxipirrolidina, 16**

$^{13}\text{C RMN } \delta$  (ppm) (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.94 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-orto $\text{SO}_2\text{Ph}$ ), 7.67-7.48 (3H, m, H-meta $\text{SO}_2\text{Ph}$  y H-para $\text{SO}_2\text{Ph}$ ), 7.26-7.16 (3H, m, H-Ar), 6.91-6.87 (2H, m, H-Ar), 6.53 (1H, s, H<sub>A</sub>-2'), 6.27 (1H, s, H<sub>B</sub>-2'), 5.90-5.70 (3H, m,  $\text{CH}_2$ -1' y H-2'), 5.2 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -3'),

4.29 (1H, dd,  $J = 2.6$  y  $6.4$  Hz, H-3), 4.05 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-4), 3.65 (1H, d,  $J = 2.6$  Hz, H-2), 3.48 (1H, d,  $J = 14.8$  Hz,  $H_A-CH_2Bn$ ), 3.20 (1H, d,  $J = 14.8$  Hz,  $H_B-CH_2Bn$ ), 2.70–2.64 (1H, m, H-5), 1.28 (3H, s, Me-acetónido), 1.13 (3H, s, Me-acetónido).

### 5.3.6. Reacción de metátesis de **15**



Sobre una disolución de 17.1 mg de la mezcla de **15** y **16** (0.05 mmol) en 11 mL de DCM se añaden 4.4 mg de catalizador de Grubbs de segunda generación. La mezcla se calienta a reflujo de DCM durante 2 h, bajo atmósfera de argón. A continuación se deja alcanzar t.a. y se añaden 7  $\mu\text{L}$  de DMSO (0.05 mmol). La mezcla se mantiene en agitación toda la noche a t.a. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando Hexano:AcOEt (8:2) como eluyente, aislándose el análogo de calistegina **17** (4.5 mg, 31%) y recuperándose el material de partida **16**.

### **(1S,5R,6R,7S)-8-Benzil-6,7-isopropilidendioxi-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-eno, 17**

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  (ppm) (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.26-7.21 (5H, m, H-Ar), 5.12 (1H, m, H-8), 5.06 (1H, m, H-7), 4.24 (2H, m, H-3 y H-4), 3.70-3.50 (3H, m, H-2 y  $CH_2Bn$ ), 3.33-3.21 (1H, m, H-5), 2.33 (2H, m, H-6), 1.29 (3H, s, Me-acetónido), 1.14 (3H, s, Me-acetónido).

#### **5.4. Metodología del estudio toxicológico**

El estudio toxicológico se ha realizado en el laboratorio de “Neurorreceptores y Dolor” del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL), bajo la supervisión de la Dra. Verónica González Núñez.\*

##### **5.3.1. Animales**

El modelo seleccionado para llevar a cabo los ensayos de toxicidad es el pez cebra (*Danio rerio*) que presenta una serie de ventajas como su pequeño tamaño, su gran descendencia, la transparencia y el rápido desarrollo de los embriones. Además, este organismo permite el análisis *in vivo* del desarrollo de muchas de las características de los vertebrados tales como el sistema excretor, el corazón, la hematopoyesis y el sistema nervioso.<sup>24</sup> Muchos estudios utilizan el pez cebra como organismo modelo para el descubrimiento y la validación de nuevos fármacos y dianas farmacológicas, para el análisis toxicológico o para analizar los efectos biológicos de drogas de abuso como los opiáceos y la cocaína.<sup>25,26</sup>

Los peces adultos se mantienen en una serie de peceras a una temperatura de 28 °C y un pH de 7. En todos los casos se han tomado las medidas adecuadas para minimizar el sufrimiento del animal. Respecto al cumplimiento de la normativa vigente, los animales se han tratado de acuerdo con las directrices aprobadas por la legislación española (Real Decreto 53/2013, BOE34, del 8 de febrero de 2013, pp. 11370-11421).

##### **5.3.2. Compuestos a evaluar**

Para el ensayo se han seleccionado los análogos de cocaína **8**, **9** y **11**. Se han administrado cinco dosis de cada compuesto: 150 µM, 50 µM, 15 µM, 5 µM y 1.5 µM. Las disoluciones se preparan mediante diluciones seriadas de forma que las concentraciones finales en los pocillos son las mencionadas anteriormente. Se utiliza DMSO como disolvente, a una concentración final de 1% DMSO en medio de mantenimiento de los embriones (medio E3: sales NaCl 5 µM, KCl 0.17 µM, CaCl<sub>2</sub> 0.33 µM, MgSO<sub>4</sub> 0.33 µM y azul de metileno como bactericida).

---

\*Gracias a la Dra. Verónica González Núñez por su ayuda y disposición en la realización del estudio toxicológico.

### **5.3.3. Instrumentación**

Para la revisión de los embriones se ha empleado un estereomicroscopio Zeiss Stereo Discovery. Las imágenes representativas se han tomado con una cámara Zeiss AxioCam ICc 3 acoplada a un ordenador con un software de procesamiento de imágenes AxioVision (AxioVs 40).

### **5.3.4. Parte experimental**

En primer lugar, se lleva a cabo el cruce de los peces. Para ello, se introducen 2 machos y 3 hembras en cada pecera de cría la tarde anterior al comienzo del ensayo, ya que la puesta suele estar inducida por la luz.

A la mañana siguiente se procede a la recogida de los huevos, que quedan depositados en el fondo de la pecera atravesando un sistema de filtro. Es necesario retirar los peces antes de recoger los embriones y, para ello, se realiza la separación de machos y hembras. Existen varios criterios de diferenciación a la hora de llevar a cabo la separación: los machos son más fusiformes y más rojizos que las hembras y, además, éstas presentan una papila urogenital al contrario que los machos. Posteriormente, se recogen los huevos y se colocan en placas Petri que contienen medio E3.

A continuación se realiza la separación de embriones viables y no viables mediante un estereomicroscopio. Con la ayuda de una lanceta y una pipeta Pasteur se seleccionan solo aquellos huevos que han sido fecundados y siguen un desarrollo normal. Una vez seleccionados los embriones viables, éstos se colocan en placas de doce pocillos, de forma que hay 20 embriones en cada pocillo. Cada pocillo contiene 2 mL de medio E3 fresco. Pasadas 5 horas post-fecundación (hpf) se administran 20  $\mu$ L de las dosis correspondientes de cada compuesto, teniendo en cuenta que se establecen controles que únicamente contienen medio E3 o medio DMSO 1% en E3. Los embriones se incuban en la estufa a 28 °C con las diferentes dosis de análogos de cocaína.

Se llevan a cabo revisiones a las 24, 48 y 72 hpf. Para ello, se hace recuento de los embriones muertos y de los embriones que han sufrido alteraciones mediante su observación en el estereomicroscopio y se toman imágenes representativas de cada pocillo. A las 24 hpf y 48 hpf se retiran los embriones muertos y se renueva el medio en cada pocillo, así como se añade una dosis fresca de cada compuesto. Se vuelven a

incubar los embriones con los compuestos. A las 72 hpf se separa el sobrenadante de los embriones y se congelan ambas fracciones en eppendorfs para posteriormente analizar la cantidad de compuesto incorporado en los embriones.

Se han realizado tres réplicas del estudio en las mismas condiciones.

#### **5.3.5. Extracción de los compuestos.**

Para conocer la cantidad de compuesto que ha sido degradada y la que ha sido incorporada por el embrión es necesaria su extracción. Para la extracción se utiliza formiato amónico ( $\text{HCOONH}_4$ , pH=9) que posee un pH adecuado para ello. Una vez añadido el  $\text{HCOONH}_4$  (60  $\mu\text{L}$ ), los embriones se homogeneizan con la ayuda de pistilos y jeringuillas de insulina.

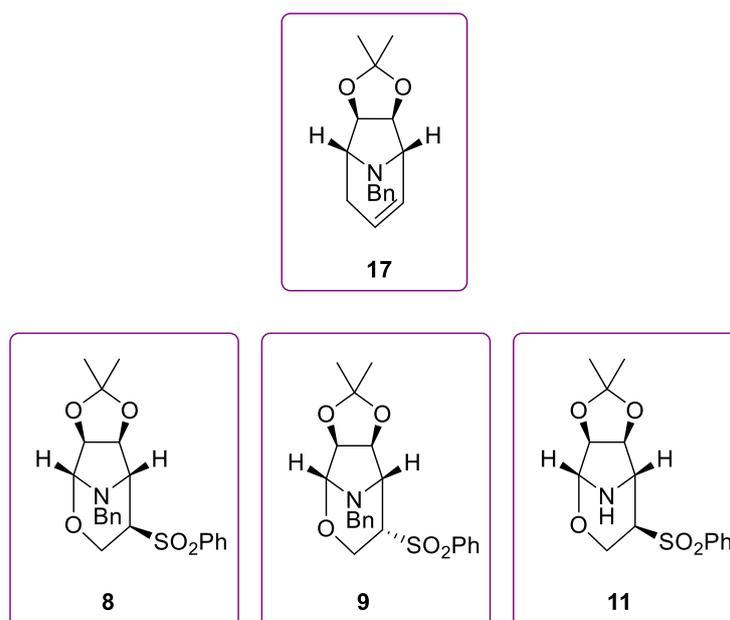
Posteriormente, esta mezcla se somete a centrifugación (6000  $g$ , 4 °C, 20 min), de forma que se obtiene un pellet insoluble (restos de embriones) y un sobrenadante que contiene los análogos de cocaína.

Tanto el sobrenadante congelado al finalizar el ensayo, como el sobrenadante extraído, así como una muestra de 100  $\mu\text{L}$  15 mM de **8**, **9** y **11** se envían al Servicio General de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca para realizar las medidas. El análisis se realiza mediante cromatografía líquida de HPLC, empleando como detección un espectrómetro de masas con ionización por electrospray en modo positivo.

## 6. Conclusiones

Según lo expuesto en este trabajo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido la síntesis de un análogo de calistegina, **17**, objetivo general de este trabajo, mediante una nueva metodología. La síntesis de **17** se ha llevado a cabo en 7 pasos.
- Se han sintetizado los análogos de cocaína **8**, **9** y **11** y se ha llevado a cabo su estudio toxicológico tomando como modelo embriones del pez cebra (*Danio rerio*).
- El estudio toxicológico indica que existen diferencias significativas entre la dosis de 150  $\mu\text{M}$  y los controles a las 48 hpf y 72 hpf para los tres compuestos. No se observan diferencias estadísticamente significativas para dosis inferiores, por lo que se puede establecer que la dosis más alta (150  $\mu\text{M}$ ) es la dosis letal mínima para los tres compuestos (**8**, **9** y **11**).
- Se han enviado las muestras extraídas del estudio toxicológico (**8**, **9** y **11**) al Servicio General de Espectrometría de Masas de la USAL para la determinación de la degradación e incorporación de los compuestos en los embriones.



**Figura 15.** Análogo de calistegina (**17**) y análogos de cocaína (**8**, **9** y **11**) sintetizados en este trabajo

## 7. Bibliografía

---

1. Gaich, T.; Baran, P. S. Aiming for the Ideal Synthesis. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4657-4673.
2. P.M. Dewick, Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, **2009**, *8*, 311
3. Mercer, T. B.; Jenkinson, S. F.; Bartholomew, B.; Nash, R. J.; Miyauchi, S.; Kato, A.; Fleet, G. W. J. Looking glass inhibitors: both enantiomeric N-benzyl derivatives of 1,4-dideoxy-1,4-imino-d-lyxitol [a potent competitive inhibitor of  $\alpha$ -d-galactosidase] and of 1,4-dideoxy-1,4-imino-l-lyxitol [a weak competitive inhibitor of  $\alpha$ -d-galactosidase] inhibit naringinase, an  $\alpha$ -l-rhamnosidase competitively. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2368-2373.
4. Compain, P.; Martin, O. R. Iminosugars: From Synthesis to Therapeutics Applications, Wiley-VHC, Weinheim, **2007**.
5. Ribés Vidal, Celia. Síntesis de pirrolidinas y pirrolizidinas con actividad inhibidora de glicosidasas y glicotransferasas. Tesis doctoral, Universitat Jaume I, **2008**.
6. Borges de Melo, E.; da Silveira Gomes, A.; Carvalho, I.  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10277-10302
7. Tepfer, D.; Goldmann, A.; Pamboukdjian, N.; Maille, M.; Lepingle, A.; Chevalier, D.; Dénarié, J.; Rosenberg, C. A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 1153-1161.
8. Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645-1680.
9. Nash, R. J.; Rothschild, M.; Porter, E. A.; Watson, A. A.; Waigh, R. D.; Waterman, P. G. Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth (*Acherontia atropus*). *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1281-1283.
10. Kaliappan, K. P.; Das, P.; Chavan, S. T.; Sabharwal, S. G. A Versatile Access to Calystegine Analogues as Potential Glycosidases Inhibitors. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6266-6274.

11. Beuming, T.; Kniazeff, J.; Bergmann, M. L.; Shi, L.; Gracia, L.; Raniszewska, K.; Newman, A. H.; Javitch, J. A.; Weinstein, H.; Gether, U.; Loland, C. J. The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat. Neurosci.* **2008**, 11, 780-789.
12. Dahal, R. A.; Pramod, A. B.; Sharma, B.; Krout, D.; Foster, J. D.; Cha, J. H.; Cao, J.; Newman, A. H.; Lever, J. R.; Vaughan, R. A.; Henry, L. K. Computational and Biochemical Docking of the Irreversible Cocaine Analog RTI 82 Directly Demonstrates Ligand Positioning in the Dopamine Transporter Central Substrate-binding Site. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 29712-29727.
13. Schmitt, K. C.; Rothman, R. B.; Reith, M. E. A. Nonclassical Pharmacology of the Dopamine Transporter: Atypical Inhibitors, Allosteric Modulators, and Partial Substrates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, 346, 2-10
14. Flores, MF. Aplicación de la reactividad de nitronas y sulfonas a la síntesis de sistemas pirrolidínicos quirales. Tesis doctoral, Universidad de Salamanca, **2013**.
15. Brandi, A.; Cardona, F.; Cicchi, S.; Cordero, F. M.; Goti, A. Stereocontrolled Cyclic Nitron Cycloaddition Strategy for the Synthesis of Pyrrolizidine and Indolizidine Alkaloids. *Chem. Eu. J.* **2009**, 15, 7808-7821.
16. Cicchi, S.; Marradi, M.; Vogel, P.; Goti, A. One-Pot Synthesis of Cyclic Nitrones and Their Conversion to Pyrrolizidines: 7 $\alpha$ -epi-Crotanecine Inhibits  $\alpha$ -Mannosidases. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1614-1619.
17. Martin, J. N.; Jons, R. C.; Padwa, A., Nitrones. In *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition. Chemistry Towards Heterocycles and Natural Products*, Pearson, W. H., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, **2003**. Chapter 1.
18. Flores, M.; Garcia-Garcia, P.; Garrido, N. M.; Marcos, I. S.; Sanz, F.; Diez, D. From isoxazolidines to tetrahydro-1,3-oxazines for the synthesis of chiral pyrrolidines. *RSC Adv.* **2012**, 2, 11040-11048.
19. Cicchi, S.; Goti, A.; Brandi, A.; Guarna, A.; De Sarlo, F. 1,3-Aminoalcohols by reductive cleavage of isoxazolidines with molybdenum hexacarbonyl. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 3351-3354.

20. Nitta, M.; Kobayashi, T. Metal-carbonyl-induced reaction of isoxazoles. Ring cleavage and reduction by hexacarbonylmolybdenum, pentacarbonyliron, or nonacarbonyliron. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 1401-1406.
21. Grubbs, R. H. Olefin metathesis. *Tetrahedron* **2004**, 60, 7117-7140.
22. Núñez, F.; Estudios mecanísticos de metátesis de olefinas con catalizadores tipo Grubbs-Hoveyda: activación y recuperación del precursor y selectividad del ciclo catalítico. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, **2012**.
23. Kimmel, C. B.; Ballard, W. W.; Kimmel, S. R.; Ullmann, B.; Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* **1995**, 203, 253-310.
24. Detrich, H. W.; Westerfield, M.; Zon, L. I. Chapter 1 Overview of the Zebrafish System. *Methods Cell Biol.* **1998**, 59, 3-10.
25. Darland, T.; Dowling, J. E. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 11691-11696.
26. Gonzalez-Nunez, V.; Rodríguez, R. E. The Zebrafish: A Model to Study the Endogenous Mechanisms of Pain. *ILAR J.* **2009**, 50, 373-386.

## Anexo I

A continuación se presentan las **Tablas 3-11** con los resultados de la mortalidad y las malformaciones obtenidos en el estudio toxicológico de los análogos de cocaína **8, 9** y **11**.

Las malformaciones se clasifican en función de su gravedad como:

- Severas: retraso en el desarrollo mayor de 10 h, malformaciones en el sistema nervioso central, bradicardia severa, edema pericárdico severo, escoliosis severa, movilidad nula.
- Moderadas: retraso en el desarrollo entre 5 y 10 h, bradicardia moderada, edema pericárdico moderado, disminución moderada de la movilidad.
- Leves: retraso en el desarrollo menor de 5 h, leve disminución de la movilidad.

En cuanto a la pigmentación, en algunos casos se han observado diferencias, pero éstas pueden ser intrínsecas de la especie.

TOXICOLOGÍA 1					
24 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	1	0	0	0	0
C- (2)	0	0	0	0	0
C- 1% DMSO (1)	2	0	0	0	0
C- 1% DMSO (2)	2	0	0	0	0
8	150 µM	2	18	0	0
	50 µM	0	0	0	0
	15 µM	1	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0
9	150 µM	1	19	0	0
	50 µM	0	0	2	0
	15 µM	0	0	3	0
	5 µM	0	0	3	0
	1.5 µM	0	0	2	0
11	150 µM	0	10	0	0
	50 µM	0	0	3	0
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	1	0	2	0
	1.5 µM	1	0	0	0

**Tabla 3.** Mortalidad y malformaciones a las 24 hpf. Estudio 1

TOXICOLOGÍA 1					
48 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	1	0	0	0	0
C- (2)	0	0	0	0	0
C- 1% DMSO (1)	2	0	0	0	0
C- 1% DMSO (2)	2	0	0	0	0
8	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	0	20	0	0
	15 µM	2	0	18	0
	5 µM	0	0	0	20
	1.5 µM	0	0	20	0
9	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	2	18	0	0
	15 µM	1	0	0	0
	5 µM	0	1	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0
11	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	0	10	10	0
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	1	0	0	0
	1.5 µM	3	0	17	0

Tabla 4. Mortalidad y malformaciones a las 48 hpf. Estudio 1

TOXICOLOGÍA 1					
72 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	1	0	0	0	0
C- (2)	0	0	0	0	0
C- 1% DMSO (1)	2	0	0	0	0
C- 1% DMSO (2)	2	0	0	0	0
8	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	2	18	0	0
	15 µM	2	0	18	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	20
9	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	4	0	16	0
	15 µM	1	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0
11	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	1	19	0	0
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	1	1	0	0
	1.5 µM	10	0	0	0

Tabla 5. Mortalidad y malformaciones a las 72 hpf. Estudio 1

TOXICOLOGÍA 2					
24 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	0	0	0	0	
C- (2)	0	0	0	0	
C- 1% DMSO (1)	1	0	0	0	
8	150 µM	12	8	0	0
	50 µM	0	0	0	0
	15 µM	2	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0
9	150 µM	0	10	0	0
	50 µM	0	0	0	0
	15 µM	2	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	1	1	1	0
11	150 µM	2	10	0	0
	50 µM	0	0	0	0
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	1	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0

Tabla 6. Mortalidad y malformaciones a las 24 hpf. Estudio 2

TOXICOLOGÍA 2					
48 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	0	0	0	0	
C- (2)	0	0	0	0	
C- 1% DMSO (1)	1	0	0	0	
8	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	0	9	11	0
	15 µM	2	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0
9	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	0	0	20	0
	15 µM	2	0	0	12
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	1	0	0	4
11	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	1	0	18	1
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	1	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0

Tabla 7. Mortalidad y malformaciones a las 48 hpf. Estudio 2

TOXICOLOGÍA 2					
72 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	0	0	0	0	
C- (2)	0	0	0	0	
C- 1% DMSO (1)	1	0	0	0	
8	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	1	19	0	0
	15 µM	2	0	18	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0
9	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	0	0	16	0
	15 µM	2	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	1	0	0
11	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	5	15	0	0
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	1	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0

Tabla 8. Mortalidad y malformaciones a las 72 hpf. Estudio 2

TOXICOLOGÍA 3					
24 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	0	0	0	0	
C- (2)	0	0	0	0	
C- 1% DMSO (1)	2	0	0	0	
8	150 µM	0	20	0	0
	50 µM	0	0	0	20
	15 µM	1	0	0	0
	5 µM	1	0	0	0
	1.5 µM	1	0	0	0
9	150 µM	1	19	0	0
	50 µM	0	0	0	0
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	0	1	0
11	150 µM	2	18	0	0
	50 µM	1	0	0	19
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	1	0	0	0

Tabla 9. Mortalidad y malformaciones a las 24 hpf. Estudio 3

TOXICOLOGÍA 3					
48 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	0	0	0	0	0
C- (2)	0	0	0	0	0
C- 1% DMSO (1)	1	0	0	0	0
8	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	0	20	0	0
	15 µM	0	0	0	19
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	1	0	0	0
9	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	0	2	18	0
	15 µM	2	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	0	0	0
11	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	1	0	19	0
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	1	0	0	0

Tabla 10. Mortalidad y malformaciones a las 48 hpf. Estudio 3

TOXICOLOGÍA 3					
72 hpf					
Grupo	Mortalidad	Alteraciones			
		Severas	Moderadas	Leves	
C- (1)	0	0	0	0	0
C- (2)	0	0	0	0	0
C- 1% DMSO (1)	1	0	0	0	0
8	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	1	16	3	0
	15 µM	0	0	0	20
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	1	1	0	0
9	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	1	19	0	0
	15 µM	2	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	0	1	0	0
11	150 µM	20	0	0	0
	50 µM	1	19	0	0
	15 µM	0	0	0	0
	5 µM	0	0	0	0
	1.5 µM	1	0	0	0

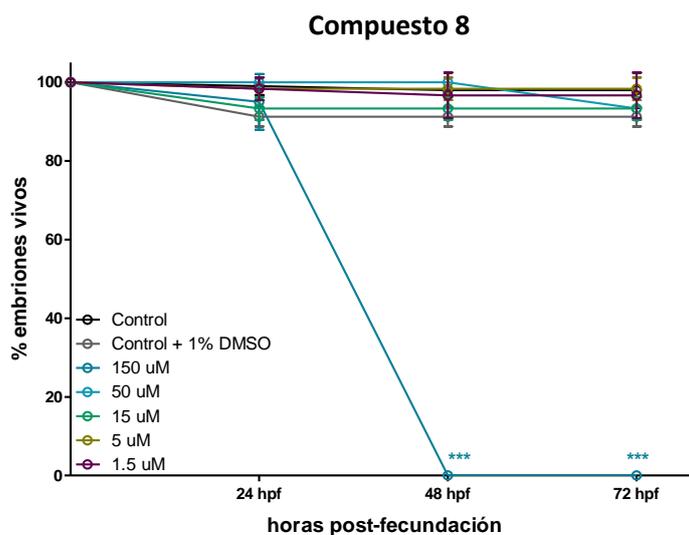
Tabla 11. Mortalidad y malformaciones a las 72 hpf. Estudio 3

**Mortalidad**

Se ha calculado la media del porcentaje de embriones vivos junto a su desviación estándar (**Tabla 12**) para cada dosis de cada compuesto y se ha representado frente a cada estadio evolutivo (**Figuras 16, 17 y 18**).

		COMPUESTOS									
		hpf	8			9			11		
			%vivos	n	SD	%vivos	n	SD	%vivos	n	SD
Dosis/ $\mu$ M	150	24	95,00	n=2	7,07	96,67	n=3	2,89	93,33	n=3	5,77
		48	0,00	n=3	0,00	1,67	n=3	2,89	6,67	n=3	5,77
		72	0,00	n=3	0,00	0,00	n=3	0,00	0,00	n=3	0,00
	50	24	100,00	n=3	0,00	100,00	n=3	0,00	98,33	n=3	2,89
		48	100,00	n=3	0,00	96,67	n=3	5,77	96,67	n=3	2,89
		72	93,33	n=3	2,89	91,67	n=3	10,41	95,00	n=3	0,00
	15	24	93,33	n=3	2,89	96,67	n=3	5,77	100,00	n=3	0,00
		48	93,33	n=3	2,89	95,00	n=3	5,00	100,00	n=3	0,00
		72	93,33	n=3	2,89	95,00	n=3	5,00	100,00	n=3	0,00
	5	24	98,33	n=3	2,89	100,00	n=3	0,00	96,67	n=3	2,89
		48	98,33	n=3	2,89	100,00	n=3	0,00	96,67	n=3	2,89
		72	98,33	n=3	2,89	100,00	n=3	0,00	96,67	n=3	2,89
	1,5	24	98,33	n=3	2,89	96,67	n=3	2,89	96,67	n=3	2,89
		48	96,67	n=3	5,77	96,67	n=3	2,89	93,33	n=3	7,64
		72	96,67	n=3	5,77	96,67	n=3	2,89	81,67	n=2	3,54
	Control	24	99,00	n=5	2,24						
		48	98,00	n=5	4,47						
		72	98,00	n=5	4,47						
Control 1% DMSO	24	91,25	n=4	2,50							
	48	91,25	n=4	2,50							
	72	91,25	n=4	2,50							

**Tabla 12.** % embriones vivos y desviación estándar en cada tratamiento



**Figura 16.** Representación gráfica de % embriones vivos frente a hpf para 8

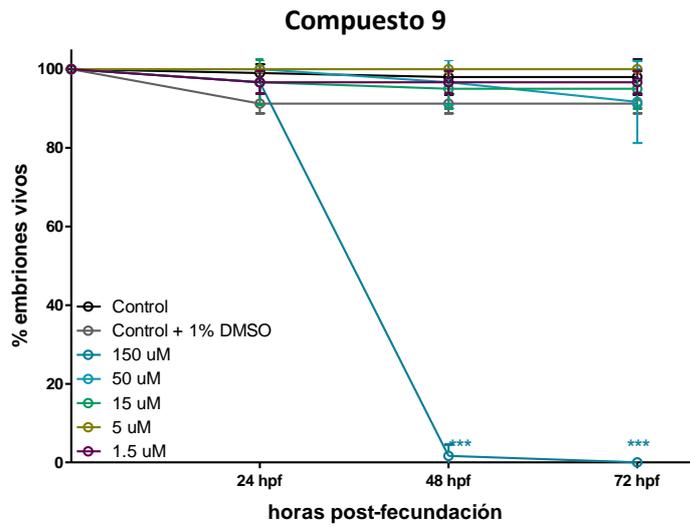


Figura 17. Representación gráfica de % embriones vivos frente a hpf para 9

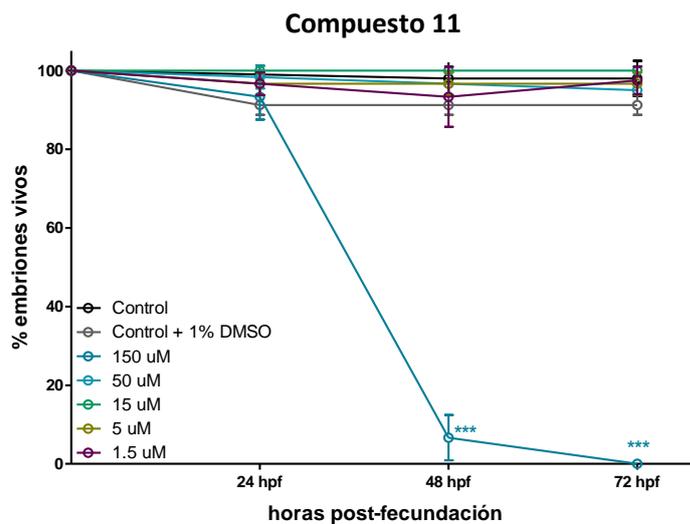


Figura 18. Representación gráfica de % embriones vivos frente a hpf para 11

A continuación, se muestran los resultados estadísticamente significativos obtenidos en el análisis estadístico de la mortalidad. En primer lugar, se ha realizado un test ANOVA de dos vías para estudiar simultáneamente los efectos de dos fuentes de variación (dosis y estadio). En segundo lugar, se han llevado a cabo los test de Bonferroni para saber entre que grupos hay diferencias estadísticamente significativas (**Tablas 13, 14 y 15**).

COMPUESTO 8				
ANOVA DE DOS VÍAS				
Fuente de variación	% total de variación		P valor	Significación
Interacción	30,36		<0,0001	***
Dosis	28,94		<0,0001	***
Estadío	7,97		<0,0001	***
BONFERRONI				
Control vs 150 $\mu$ M				
Estadío	Control	150 $\mu$ M	P valor	Significación
0 hpf	100	100	P>0.05	no
24 hpf	99	95	P>0.05	no
48 hpf	98	0	P<0.05	***
72 hpf	98	0	P<0.05	***

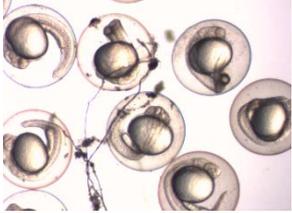
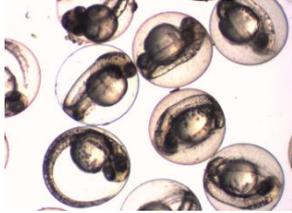
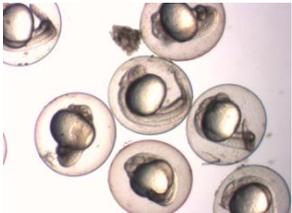
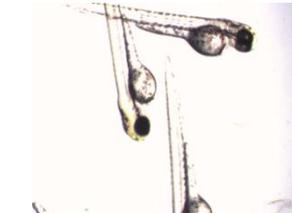
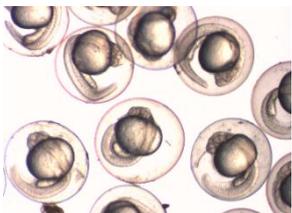
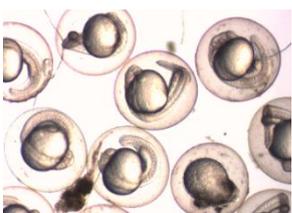
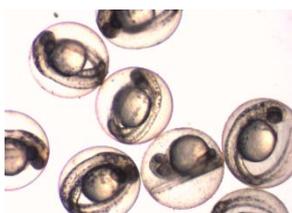
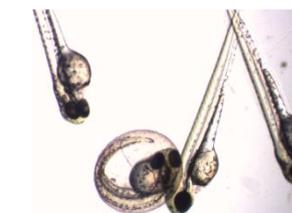
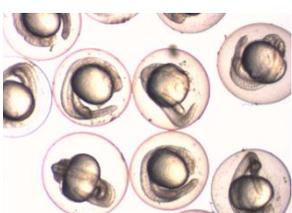
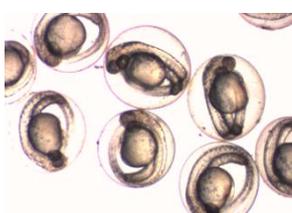
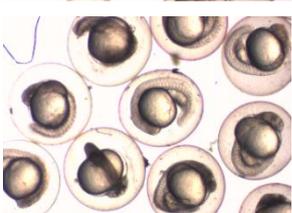
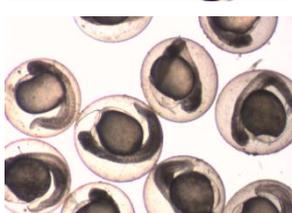
COMPUESTO 9				
ANOVA DE DOS VÍAS				
Fuente de variación	% total de variación		P valor	Significación
Interacción	36,05		<0,0001	***
Dosis	30,49		<0,0001	***
Estadío	8,54		<0,0001	***
BONFERRONI				
Control vs 150 $\mu$ M				
Estadío	Control	150 $\mu$ M	P valor	Significación
0 hpf	100	100	P>0.05	no
24 hpf	99	96,67	P>0.05	no
48 hpf	98	1,67	P<0.05	***
72 hpf	98	0	P<0.05	***

COMPUESTO 11				
ANOVA DE DOS VÍAS				
Fuente de variación	% total de variación		P valor	Significación
Interacción	34,55		<0,0001	***
Dosis	31,68		<0,0001	***
Estadío	7,97		<0,0001	***
BONFERRONI				
Control vs 150 $\mu$ M				
Estadío	Control	150 $\mu$ M	P valor	Significación
0 hpf	100	100	P>0.05	no
24 hpf	99	95	P>0.05	no
48 hpf	98	0	P<0.001	***
72 hpf	98	0	P<0.001	***

Tablas 13, 14 y 15. ANOVA y Bonferroni de los compuestos 8, 9 y 11

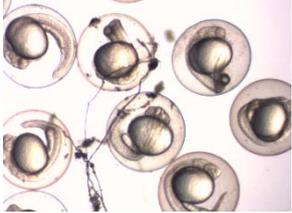
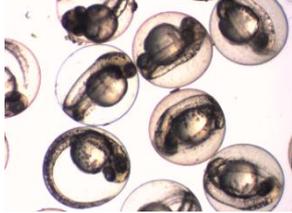
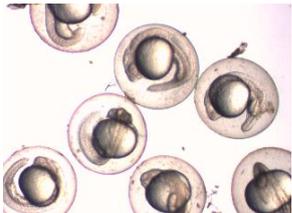
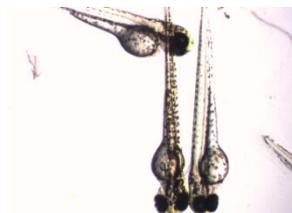
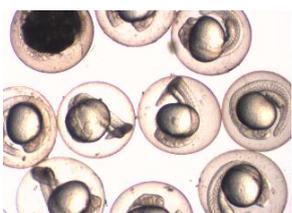
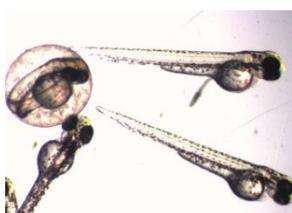
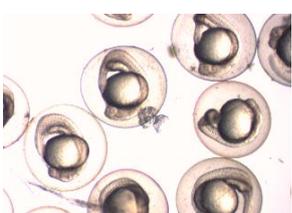
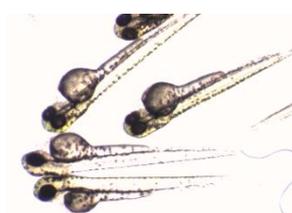
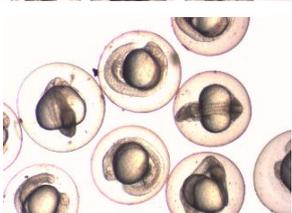
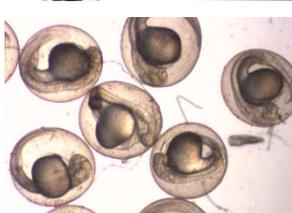
## Anexo II

En este anexo se presentan las imágenes representativas correspondientes al Estudio Toxicológico 2. En las columnas se representan los diferentes estadios evolutivos y en las filas las dosis administradas de cada compuesto (Tablas 16, 17 y 18).

<b>Compuesto 8</b>			
GRUPO	24hpf	48hpf	72hpf
Control			
1,5 $\mu$ M			
5 $\mu$ M			
15 $\mu$ M			
50 $\mu$ M			
150 $\mu$ M			

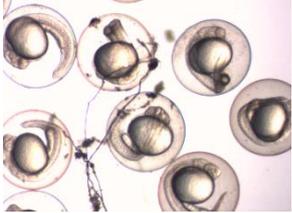
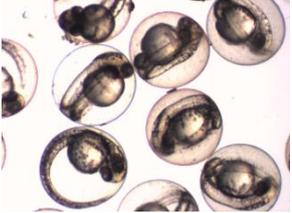
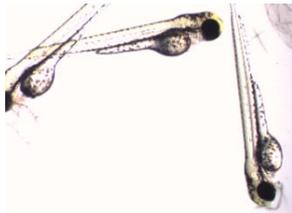
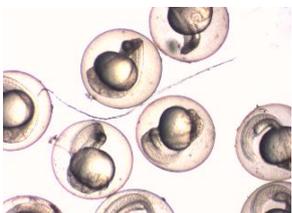
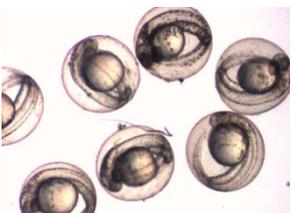
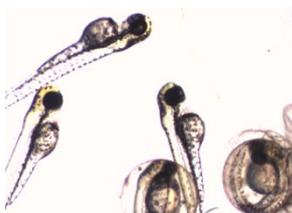
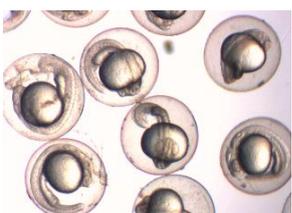
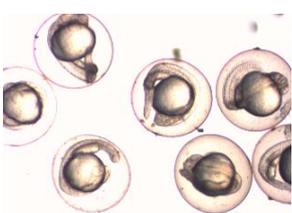
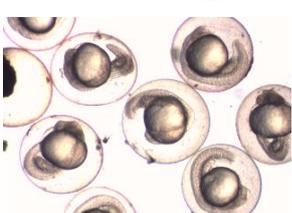
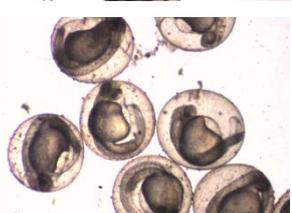
**Tabla 16.** Imágenes representativas de los embriones tratados con el compuesto 8

## Compuesto 9

GRUPO	24hpf	48hpf	72hpf
Control			
1,5 $\mu\text{M}$			
5 $\mu\text{M}$			
15 $\mu\text{M}$			
50 $\mu\text{M}$			
150 $\mu\text{M}$			

*Tabla 17. Imágenes representativas de los embriones tratados con el compuesto 9*

### Compuesto 11

GRUPO	24hpf	48hpf	72hpf
Control			
1,5 $\mu$ M			
5 $\mu$ M			
15 $\mu$ M			
50 $\mu$ M			
150 $\mu$ M			

**Tabla 18.** Imágenes representativas de los embriones tratados con el compuesto 11

