

UCH-FC  
DOC-Q  
H 895  
C. 1

**ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL RECEPTOR  
DOPAMINERGICO D<sub>1</sub> Y D<sub>2</sub> Y DESARROLLO DE  
NUEVOS LIGANDOS BASADOS EN LA  
ESTRUCTURA DE  
3-METOXIDIBENZ[*d,g*]ACECINA**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial  
para optar al grado de**

**DOCTOR EN QUÍMICA**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**Estefanía Andrea Hugo Caselli**

**Septiembre, 2016**

**Director de Tesis Dr: Bruce K. Cassels  
Co-Director de Tesis Dra: Angélica Fierro**



**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

**ESTEFANÍA ANDREA HUGO CASELLI**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 19 de Agosto del 2016.

**Director de Tesis**  
**Dr. Bruce K. Cassels**

  
.....

**Co-Director de Tesis**  
**Dra. Angélica Fierro**

  
.....

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dr. Ramiro Araya**

  
.....

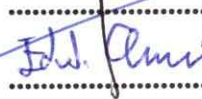
**Dr. Hernán Pessoa**

.....

**Dr. Marcos Caroli**

  
.....

**Dr. Eduardo Chamorro**

  
.....



...a los que creyeron en mi....



La tesis doctoral que le presento por medio de este libro, abarcó más años de mi vida que lo pensado. En el comienzo de ella, no tenía en mente lo difícil y empinado que se pondría su realización. Todo comenzó por escoger un tema interesante, pero desconocido en todas sus aristas. En fin, la inexperiencia, fue clave para su largo desarrollo.

Volver atrás es en vano, hoy creo sin duda que esta tesis aumentó el alcance de mis conocimientos en aéreas que en algún momento de mi formación de pregrado deseché como parte de mi futuro. También su realización me llevó, en la mitad del proceso, a lo más profundo de la desazón, lo que me permitió ver la vida de otra forma y desde allí resignificar mi manera de realizar ciencia. Este momento también fue clave para recomenzar mi desarrollo integral como persona permitiendo generar el arte que les expongo, en parte, al finalizar este libro.

El proceso global del doctorado, abarco siete años desde que me presente en la oficina del Profesor Bruce K. Cassels, interesada en trabajar en su laboratorio, en ese momento tenía recién veintidós años.....en fin, fue un largo camino.

## **Agradecimientos**

Les agradezco infinitamente a todos aquellos que me aportaran con emociones y conocimientos para realizar esta tesis doctoral y el doctorado como tal.

Al Dr. Bruce K. Cassels (profe Bruce) por confiar en mi y recibirme en su laboratorio cuando como antecedente le dijeron que era rara.

A la Dr. Angélica Fierro (Ange) por recibirme y creer en mi, por los cafecitos aconsejado, por su tiempo en esos ensayos funestos, por tu amistad, Muchas gracias.

A la Dr. Alejandra Gallardo-Godoy (Ale) por los consejos en síntesis orgánica y por recibirme como parte de su casa.

A todos los biodinámicos que conocí y que estoy conociendo. Aquí me detendré en algunos personajes: Caro por estar cuando llegue y por la amistad que hemos mantenido hasta hoy; Álvaro y Mario por las conversas; Lule, Juani y Su; por esos días de risas; Xilly, por apañar y por esas juntas conversadas; Tirapegui, por la música que inspiró la obra "Para salir del laberinto hay que caer"; Marcelo, por los consejos y como no a los bailarines motivados: Massa, Nico, Julio, Suarez, Martín y Rene.

A los chicos de la Cato. A Mauricio (Mabri) por las conversas y consejos de Arte y a Janette, Nico y Karen por recibirme y compartir como si nos conociéramos hace mucho.

A mis amigas Crespa, Roma, Fefa y Ángeles por estar cuando las he necesitado, por apañar, por las enseñanzas, por las conversas, por esas tardes de familia, por la vida que hemos compartido, por aguantar que me pegue explicando un fenómeno, por no dejar que se me olvide tener vida.

A Antonia, que con sus preguntas me hace buscar el mejor ejemplo para explicar lo más elevado de la Química.

A Rodrigo Torres (Mago) por entregar tu amor y conocimiento a mi vida.

A los compas del colectivo octubre que me hacen mantener presente la causa y su significado.

A mi Madre, a mi Padre y Hermana por apoyarme incondicionalmente, por creer en mi, por la perseverancia que me enseñaron desde pequeña, por su amor.

A todos Muchas Gracias.

## Índice de Materias

|  | Página |
|--|--------|
| Índice de Materias   | ii     |
| Lista de Tablas  | iv     |
| Lista de Figuras   | vi     |
| Lista de Abreviaturas  | x      |
| Resumen  | xiv    |
| Abstract   | xv     |
| Introducción   | 1      |
| Hipótesis  | 15     |
| Objetivos  | 16     |
| Resultados y Discusión   | 17     |
| Simulación Molecular   | 17     |
| Construcción de los modelos de los receptores<br>dopaminérgicos  | 17     |
| ¿Un segundo puente de disulfuro?   | 22     |
| Comparación estructural de hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> .   | 27     |
| Acoplamiento molecular de 3-<br>metoxidibenz[d,g]acecina en los modelos del hD <sub>1</sub> y<br>del hD <sub>2</sub> | 34     |
| Potenciales modificaciones del anillo A de 3MOD  | 42     |
| Evaluación por simulación molecular de las<br>propuestas de modificación del anillo A de 3MOD                        | 46     |

|   |     |
|---|-----|
| Potenciales modificaciones del anillo B de la 3MOD  | 65  |
| Evaluación por simulación molecular de las propuestas de modificación del anillo B de la 3MOD | 70  |
| Síntesis Orgánica   | 77  |
| Síntesis de 3MOD  | 83  |
| Síntesis de derivados de 3MOD modificados en el anillo A.                                     | 83  |
| Síntesis de derivados de 3MOD en el anillo B.   | 89  |
| Propuesta de mecanismo de formación de 31b  | 108 |
| Síntesis de derivados halogenados en C-12 de escoulerina                                      | 114 |
| Conclusiones  | 135 |
| Metodología   | 139 |
| Simulación Molecular  | 139 |
| Síntesis Orgánica   | 143 |
| Bibliografía  | 158 |
| Anexo A. Simulación Molecular   | 172 |
| Anexo B. Espectrometría de Masas  | 191 |
| Anexo C. Espectrometría de RMN e Infrarrojo   | 211 |

## Lista de Tablas

|                 |   | Página |
|-----------------|---|--------|
| <b>Tabla 1</b>  | Afinidades en los receptores D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> asociadas a derivados de 1-fenilbenzacepina  | 6      |
| <b>Tabla 2</b>  | Afinidades en los receptores D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> asociadas a derivados de SCH-39166.  | 7      |
| <b>Tabla 3</b>  | Porcentaje de identidad aminoacídica entre receptores GPCR-A (potenciales moldes) y los receptores a modelar hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> .  | 18     |
| <b>Tabla 4</b>  | Valores del “DOPE score” para los modelos seleccionados de hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub>  | 19     |
| <b>Tabla 5</b>  | Residuos propuestos por el programa ICM_Pro que conformarían los bolsillos ortoestéricos de hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> .   | 30     |
| <b>Tabla 6</b>  | Energías de acoplamiento molecular y constantes de inhibición experimentales de 3MOD en hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> .   | 35     |
| <b>Tabla 7</b>  | Residuos en las cavidades de unión de los complejos hD <sub>1</sub> /3MOD y hD <sub>2</sub> /3MOD.  | 38     |
| <b>Tabla 8</b>  | Residuos a 5 Å del ligando 3MOD en el hD <sub>1</sub> y en el hD <sub>2</sub> a 0 ns y 20 ns.   | 41     |
| <b>Tabla 9</b>  | Derivados de dibenz[ <i>d,g</i> ]acecinas con constante de afinidad conocidas.  | 45     |
| <b>Tabla 10</b> | Constantes de inhibición de la boldina y sus derivados halogenados en los receptores “D <sub>1</sub> -like” de homogeneizado de cuerpo estriado cerebral de rata (2006) y del D <sub>1</sub> humano expresado en células CHO-K1 (2015). | 47     |
| <b>Tabla 11</b> | E <sub>grid</sub> y E <sub>vdw</sub> para las posiciones que toma la 3-yodoboldina en el hD <sub>1</sub> .  | 50     |
| <b>Tabla 12</b> | E <sub>vdw</sub> para la posición A en el hD <sub>1</sub> de la boldina y sus derivados.  | 50     |
| <b>Tabla 13</b> | Residuos alrededor de las dos posiciones de la boldina en el hD <sub>1</sub> .  | 52     |
| <b>Tabla 14</b> | Resultados del acoplamiento molecular de 3-Xboldinas.   | 53     |
| <b>Tabla 15</b> | Constantes de afinidad en el receptor D <sub>1</sub> para las 12-Xescoulerinas.   | 62     |
| <b>Tabla 16</b> | Constantes de afinidad de 3MOD y sus derivados halogenados en el C-4 sintetizados.  | 62     |
| <b>Tabla 17</b> | Energías de acoplamiento molecular de 3MOD y derivados 4-halógeno3MOD en el hD <sub>1</sub> y en el hD <sub>2</sub> .   | 63     |
| <b>Tabla 18</b> | Resultados de acoplamiento molecular  | 71     |
| <b>Tabla 19</b> | Resultados de la reacción de oxidación de <i>isocromano</i> (4).  | 78     |
| <b>Tabla 20</b> | Resumen de las diferentes condiciones de reacción evaluadas para la obtención del compuesto 7.  | 80     |
| <b>Tabla 21</b> | Condiciones de reacción evaluadas en la obtención de 4-cloro-3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[ <i>d,g</i> ]acecina (3b).   | 84     |



|                 |   |     |
|-----------------|---|-----|
| <b>Tabla 22</b> | Condiciones de reacción evaluadas en la obtención de <i>4-bromo-3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[d,g]acecina (3c)</i> .  | 85  |
| <b>Tabla 23</b> | Condiciones de reacción evaluadas para la obtención de <i>4-metil-3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[d,g]acecina (3y)</i> .  | 87  |
| <b>Tabla 24</b> | Metodologías probadas para la síntesis del ácido <i>2-(1,3-dietoxi-1,3-dioxopropan-2-il)-4-nitrobenzoico (22)</i> .   | 95  |
| <b>Tabla 25</b> | Interpretación informada del espectro de RMN <sup>1</sup> H en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> para el compuesto <b>22</b> .  | 96  |
| <b>Tabla 26</b> | Asignación de señales del espectro de RMN <sup>1</sup> H para el compuesto <i>3-metoxi-5-nitroisocroman-1-ona (29b)</i> .   | 101 |
| <b>Tabla 27</b> | Condiciones de reacción evaluadas en la formación del compuesto <i>2-(4-benciloxi-3-metoxifenil) acetato de etilo (47b)</i> .   | 123 |
| <b>Tabla 28</b> | Pruebas de protección del grupo hidroxilo fenólico de <i>2-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acetato de etilo (47a)</i> .   | 124 |
| <b>Tabla 29</b> | Condiciones de reacción evaluadas en la síntesis de <i>2-(2-bromo-4-etoximetoxi-5-metoxifenil)acetato de etilo (48db)</i> y <i>2-(2-cloro-4-etoximetoxi-5-metoxifenil)acetato de etilo (48dc)</i> .                     | 125 |
| <b>Tabla 30</b> | Condiciones de reacción para formar $\alpha$ - <i>(N-Metilanilino)acetonitrilo (51)</i> .   | 128 |
| <b>Tabla 31</b> | Metodologías evaluadas en la formación de <i>(Z,E)-3-(3-(Benciloxi)-4-metoxifenil)-2-(metil(fenil)amino)acrilonitrilo (41)</i> y <i>(Z,E)-3-(4-(Benciloxi)-3-metoxifenil)-2-(metil(fenil)amino)acrilonitrilo (50)</i> . | 129 |
| <b>Tabla 32</b> | Asignación de señales a baja frecuencia de los componentes de la mezcla isomérica <i>Z:E</i> para el compuesto <b>41</b> .  | 131 |
| <b>Tabla 33</b> | Hidrólisis en ciclos consecutivos de las $\alpha$ -cianoenaminas <b>41</b> y <b>50</b> .  | 132 |

## Lista de Figuras

|                  |  | Página |
|------------------|--|--------|
| <b>Figura 1</b>  | Neurotransmisor dopamina.  | 1      |
| <b>Figura 2</b>  | Estructuras de moléculas base de compuestos con actividad dopaminérgica.   | 3      |
| <b>Figura 3</b>  | Esqueletos moleculares de: A) 1-fenilbenzacepinas, B) benzonaftepinas y C) 5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[ <i>d,g</i> ]acecinas.   | 5      |
| <b>Figura 4</b>  | 1-Fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1 <i>H</i> -benzacepinas y la posición de sus modificaciones detalladas en la <b>Tabla 1</b> .  | 5      |
| <b>Figura 5</b>  | Estructura de SCH-39166 y la posición de sus modificaciones detalladas en <b>Tabla 2</b> .   | 6      |
| <b>Figura 6</b>  | Derivados de 5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[ <i>d,g</i> ]acecina: A) LE-404 y B) 3MOD.   | 8      |
| <b>Figura 7</b>  | Representación de la interacción por puente de halógeno.   | 10     |
| <b>Figura 8</b>  | Derivado halogenado ensayado por Hardegger y col.  | 11     |
| <b>Figura 9</b>  | Boldina, predicentrina y sus derivados halogenados en el C-3.  | 12     |
| <b>Figura 10</b> | Representación estructural del receptor D <sub>1</sub> .   | 13     |
| <b>Figura 11</b> | Representaciones de Ramachandran de los modelos escogidos de hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> .   | 20     |
| <b>Figura 12</b> | Gráficos obtenidos del sitio web ProSa para los modelos escogidos de hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> .   | 21     |
| <b>Figura 13</b> | Alineación de las secuencias aminoácidas del segmento del e <sub>3</sub> entre hD <sub>1</sub> y las estructuras cristalinas de hD <sub>3</sub> , hA <sub>2A</sub> , hH <sub>1</sub> y hM <sub>2</sub> . | 22     |
| <b>Figura 14</b> | Gráficos de RMSD obtenidos de la dinámica de 10ns para hD <sub>1</sub> _SS y hD <sub>1</sub> _2SS  | 23     |
| <b>Figura 15</b> | Visualización de la interacción iónica R3.50-E6.30 en las estructuras utilizadas como molde  | 25     |
| <b>Figura 16</b> | Perfiles de distancias entre residuos aminoácidos que conformarían un cierre iónico hacia el lado intracelular del receptor en su estado inactivo para hD <sub>1</sub> _SS                               | 26     |
| <b>Figura 17</b> | Superposición de los modelos de los hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> .  | 28     |
| <b>Figura 18</b> | Residuos correspondientes al bolsillo ortoestérico propuestos por el programa ICM_Pro para el modelo del hD <sub>1</sub> .   | 31     |
| <b>Figura 19</b> | Residuos correspondientes al bolsillo ortoestérico propuestos por el programa ICM_pro para el modelo del hD <sub>2</sub>   | 32     |
| <b>Figura 20</b> | Estructura de 3MOD.  | 35     |
| <b>Figura 21</b> | Superposición y ampliación de los receptores hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> acoplados a 3MOD.   | 37     |
| <b>Figura 22</b> | Gráfico de RMSD obtenido de la dinámica de 20ns para hD <sub>1</sub> /3MOD   | 39     |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
|                  | y hD <sub>2</sub> /3MOD.  |    |
| <b>Figura 23</b> | Movimiento de 3MOD en el bolsillo de hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> después de 20 ns de DM.  | 40 |
| <b>Figura 24</b> | Residuos que se direccionan hacia los carbonos del anillo A en el complejo formado entre hD <sub>1</sub> /3MOD y hD <sub>2</sub> /3MOD.   | 43 |
| <b>Figura 25</b> | Estructura de la dibenz[ <i>d,g</i> ]acecina y posiciones de sustitución conocidas detalladas en la <b>Tabla 9</b> .  | 45 |
| <b>Figura 26</b> | Representación de la aplicación del “script” ESH sobre el ligando.  | 48 |
| <b>Figura 27</b> | Posiciones obtenidas a partir del AM de 3-yodoboldina con hD <sub>1</sub> por Dock 6.0  | 49 |
| <b>Figura 28</b> | Gráficos de E <sub>vdw</sub> calculadas sin y con ESH versus las constantes de inhibición experimentales actualizadas para boldina y sus derivados.                                       | 51 |
| <b>Figura 29</b> | Estructura de la boldina y numeración de las posiciones de sus átomos.  | 52 |
| <b>Figura 30</b> | Visualización de ambas orientaciones de los complejos hD <sub>1</sub> /3-Xboldina obtenidas por simulación molecular utilizando AutoDock4.  | 54 |
| <b>Figura 31</b> | Complejo hD <sub>1</sub> /3-yodoboldina, posición 1.  | 55 |
| <b>Figura 32</b> | Gráficas de RMSD en función del tiempo de la boldina y de la 3-yodoboldina.   | 57 |
| <b>Figura 33</b> | Cambio de posición observado en el transcurso de la DM de la boldina y de la 3-yodoboldina en el hD <sub>1</sub> .  | 58 |
| <b>Figura 34</b> | Evolución de la distancia entre el hidroxilo ubicado en el C-2 de la boldina y de la 3-yodoboldina y el hidroxilo de S5.42.   | 59 |
| <b>Figura 35</b> | Propuesta de interacción de la 3-yodoboldina con el hD <sub>1</sub> por medio del yodo.   | 60 |
| <b>Figura 36</b> | Estructura de la escoulerina con la posición 12 destacada.  | 61 |
| <b>Figura 37</b> | Acoplamiento molecular de 3MOD y derivados 4-halógeno3MOD en hD <sub>1</sub> y hD <sub>2</sub> .  | 63 |
| <b>Figura 38</b> | Potencial electrostático de 4-bromo3MOD.  | 64 |
| <b>Figura 39</b> | Propuesta de interacción entre el Br de 4-bromo3MOD y el segmento -O(S)H del residuo en 3.36.   | 65 |
| <b>Figura 40</b> | Residuos que se direccionan hacia los átomos de carbono del anillo B en el complejo formado entre hD <sub>1</sub> /3MOD y hD <sub>2</sub> /3MOD   | 66 |
| <b>Figura 41</b> | Propuestas de derivados de 3MOD que mejorarían su afinidad en ambos receptores.   | 68 |
| <b>Figura 42</b> | Propuestas de derivados de 3MOD que mejorarían su selectividad hacia el hD <sub>1</sub> a través de puente de hidrógeno y hacia el hD <sub>2</sub> por interacciones de tipo hidrofóbico. | 68 |
| <b>Figura 43</b> | Retrosíntesis simplificada del único derivado de 3MOD con sustitución en el anillo B.   | 70 |
| <b>Figura 44</b> | Acoplamiento molecular de derivados de la 3MOD.   | 72 |
| <b>Figura 45</b> | Ejemplo del complejo formado entre el hD <sub>1</sub> o el hD <sub>2</sub> y los derivados  | 74 |

|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
|                  | de la 3MOD con efecto electrodonor del sustituyente.   |     |
| <b>Figura 46</b> | Ejemplo del complejo formado entre el hD <sub>1</sub> o el hD <sub>2</sub> y los derivados de la 3MOD con efecto electroattractor del sustituyente.  | 76  |
| <b>Figura 47</b> | Ruta de síntesis de 3MOD.  | 77  |
| <b>Figura 48</b> | Producto secundario obtenido en la síntesis de <i>isocroman-1-ona</i> (5).   | 79  |
| <b>Figura 49</b> | Posibles estructuras del producto secundario observado en los ensayos V, VI y VII realizados para la formación de la amida 7.  | 82  |
| <b>Figura 50</b> | Compuesto sintetizado por Robaa y col., 2011.  | 82  |
| <b>Figura 51</b> | Objetivo sintético: derivados de 3MOD modificados en el anillo A.  | 83  |
| <b>Figura 52</b> | Esquema de la reacción de Suzuki para la transformación del compuesto <b>3c</b> a <b>3y</b> .  | 87  |
| <b>Figura 53</b> | Compuestos sintetizados previamente por Takaya y col. 2011   | 88  |
| <b>Figura 54</b> | Precursores <b>3d</b> y <b>3e</b> propuestos que satisfacen la versatilidad requerida para obtener los derivados <b>3f</b> , <b>3g</b> , <b>3n</b> , <b>3ñ</b> , <b>3q</b> , <b>3s</b> , <b>3u</b> y <b>3w</b> . | 90  |
| <b>Figura 55</b> | Retrosíntesis desde el derivado aminado en el anillo B de 3MOD hasta la amida precursora del compuesto tetracíclico.   | 91  |
| <b>Figura 56</b> | Primera opción retrosintética. Obtención de amida <b>10</b> ( <i>2-(2-hidroxietyl)-N-(3-metoxifeniletíl)-3-nitrobenzamida</i> ) y <b>11</b> ( <i>2-(2-hidroxietyl)-N-(3-metoxifeniletíl)-4-nitrobenzamida</i> ). | 92  |
| <b>Figura 57</b> | Segunda opción retrosintética. Obtención de la amida <b>11</b> .   | 93  |
| <b>Figura 58</b> | Síntesis propuesta para la formación de <b>11</b> .  | 93  |
| <b>Figura 59</b> | Homólogo de <b>23</b> ( <i>ácido 2-cloro-3-nitrobenzoico</i> ) propuesto para formar la amida <b>10</b> .  | 94  |
| <b>Figura 60</b> | Asignación de señales de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>22</b> .  | 96  |
| <b>Figura 61</b> | Espectros de RMN <sup>1</sup> H del compuesto obtenido de la reacción III (línea negra) y del compuesto aislado en la reacción X (línea roja).   | 97  |
| <b>Figura 62</b> | Síntesis de <i>5-nitroisocumarina</i> ( <b>29</b> ).   | 98  |
| <b>Figura 63</b> | Propuesta síntesis de la amida <b>10</b> a partir de la nitroisocumarina <b>29</b> .   | 99  |
| <b>Figura 64</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <i>3-metoxi-5-nitroisocroman-1-ona</i> ( <b>29b</b> ) y la ampliación de sus señales.   | 101 |
| <b>Figura 65</b> | Reformulación de la síntesis. Obtención de amida <b>30</b> ( <i>2-[2-(3-metoxifenil)etil]-5-nitroisoquinolin-1(2H)-ona</i> ) similar a la amida <b>10</b>  | 102 |
| <b>Figura 66</b> | Síntesis de <i>4-amino-11-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz [d,g]acecina</i> ( <b>3d</b> ) desde <b>30</b>   | 102 |
| <b>Figura 67</b> | Espectros superpuestos de RMN <sup>1</sup> H de los compuestos <b>12</b> (en negro) y <b>31</b> (en verde).  | 104 |
| <b>Figura 68</b> | Segmento del gráfico del experimento de HMBC que abarca desde los 2,5 hasta 5,5 ppm para protones y entre 15 y 80 ppm para <sup>13</sup> C, para el compuesto no identificado <b>31</b> .                        | 105 |
| <b>Figura 69</b> | Masas moleculares físicas de los compuestos: <b>12</b> , <b>14</b> y propuestas para <b>31a</b> y <b>31b</b> . Enmarcados, probables fragmentos de <b>31b</b> observados en HPLCM.                               | 106 |

|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
| <b>Figura 70</b> | Espectros de IR (línea roja) y de Raman (línea negra) del compuesto <b>31b</b> . Segmento que abarca entre los 500 y los 1000 $\text{cm}^{-1}$ .   | 107 |
| <b>Figura 71</b> | Segmentos que han conformado la estructura de la amina bicíclica.  | 108 |
| <b>Figura 72</b> | Mecanismo de apertura del biciclo; generación del carbocatión.   | 109 |
| <b>Figura 73</b> | Reacciones que conducen a la apertura del biciclo tipo octahidro-1 <i>H</i> -quinolicina: primero en presencia de diferentes fuentes de nucleófilos.   | 110 |
| <b>Figura 74</b> | Reacción que propone como parte del mecanismo de la apertura del biciclo, el paso por un derivado clorado (Maryanoff y Almond, 1986).  | 111 |
| <b>Figura 75</b> | Intermediario de reacción propuesto por la unión del cloroformiato de etilo a la molécula <b>8</b> o <b>12</b> .   | 112 |
| <b>Figura 76</b> | Representación retrosintética y sintética de los pasos claves para la formación de escoulerina.  | 115 |
| <b>Figura 77</b> | Estructuras de: escoulerina, coreximina o coramina, 12-bromonandina  | 116 |
| <b>Figura 78</b> | Síntesis de <b>35b</b>   | 117 |
| <b>Figura 79</b> | Metodologías utilizadas para la formación de <b>36a</b> y sus derivados.   | 118 |
| <b>Figura 80</b> | Rutas sintéticas utilizadas en las metodologías I desde vainillina   | 119 |
| <b>Figura 81</b> | Rutas sintéticas utilizadas en las metodologías II. A) desde vainillina y B) desde isovainillina.  | 120 |
| <b>Figura 82</b> | Grupos protectores estudiados: A) bencilo (Bn), B) 2-metoxietoximetilo (MEM) y C) etoximetoxilo (EOM). D) Grupo protector referencial: metoximetilo (MOM).   | 121 |
| <b>Figura 83</b> | Síntesis que utiliza el grupo protector MOM en la bromación del ácido 2-(2-bromo-4-metoximetil-3-metoxifenil)acético (compuesto enmarcado).  | 121 |
| <b>Figura 84</b> | Esquema de los pasos sintéticos de protección del grupo hidroxilo aromático del ácido <b>44a</b> y formación de la amida <b>50?</b> .  | 122 |
| <b>Figura 85</b> | Metodología III desde <i>O</i> -bencilisovainillina ( <b>39b</b> ) y <i>O</i> -bencilvainillina ( <b>37b</b> ).  | 127 |
| <b>Figura 86</b> | Formación de <b>51</b> .   | 128 |
| <b>Figura 87</b> | A la derecha de la figura, segmento de baja frecuencia del espectro de RMN $^1\text{H}$ de la mezcla de isómeros <i>Z:E</i> obtenida en la purificación del compuesto <b>41</b>  | 130 |
| <b>Figura 88</b> | Compuestos ( <i>Z,E</i> )-3-(3-(benciloxi)-4-metoxifenil)-2-(metil(fenil)amino)acrilonitrilo (( <i>Z,E</i> )- <b>41</b> ). y ( <i>Z,E</i> )-3-(4-(benciloxi)-3-metoxifenil)-2-(metil(fenil)amino)acrilonitrilo (( <i>Z,E</i> )- <b>50</b> ). | 131 |
| <b>Figura 89</b> | Ruta sintética para la obtención de los derivados halogenados de escoulerina desde <i>N</i> -(4-(Benciloxi)-3-metoxifeniletíl)-2-(3-(benciloxi)-4-metoxifenil)acetamida ( <b>34b</b> ).  | 133 |

## Lista de Abreviaturas

|                |  |
|----------------|--|
| 3MOD           | 3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[ <i>d,g</i> ]acecina |
| $\mu$ W        | "micro-Wave"   |
| AcOH           | Ácido acético  |
| AcOEt          | Acetato de etilo   |
| AM             | <i>Acoplamiento molecular</i>                                      |
| AMP-cíclico    | Adenosilmonofosfato cíclico  |
| APO            | Receptor sin ligando   |
| Bn             | Bencilo  |
| B-N            | Bischler-Napieralski   |
| bRh            | Receptor de rodopsina de bovino                                    |
| BTHIQ          | Benciltetrahidroisoquinolina                                       |
| c <sub>-</sub> | Laso citoplasmático  |
| CCF            | Cromatografía en capa fina   |
| CDI            | Carbonildiimidazol   |
| CGM            | Cromatografía de gases acoplada a masa                             |
| CoMFA          | "Comparative molecular field analysis"                             |
| CoMSia         | "Comparative molecular similarity analysis"                        |
| Const. Acopl.  | Constante de acoplamiento  |
| DA             | Dopamina   |
| DBU            | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno                                 |
| DCM            | Diclorometano  |
| DFT            | <i>Density functional theory</i>                                   |
| DIPEA          | Diisopropiletilamina   |
| DM             | Dinámica molecular   |
| DMAP           | 4-dimetilaminopiridina   |
| DME            | Dimetileter  |
| DMF            | Dimetilformamida   |
| DMFDMA         | Dimetilacetal de dimetilformamida                                  |
| DMSO           | Dimetilsulfoxido   |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| e <sub>...</sub>          | Laso extracelular   |
| E <sub>elect</sub>        | Energía electroestática   |
| E <sub>grid</sub>         | Puntuación energética entregada por el programa Dock 6                              |
| EDC                       | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida   |
| ELSD                      | “Evaporative light scattering detector”   |
| EOM                       | Etoximetoxilo   |
| ESH                       | “Explicit $\sigma$ -holes”  |
| Et <sub>3</sub> N         | Trietilamina  |
| EtOH                      | Etanol  |
| E <sub>vdw</sub>          | Energía de van der Waals  |
| $\Delta G$                | Energía libre de Gibb   |
| GP                        | Grupo protector   |
| GPCR                      | Receptores de membrana acoplados a proteína G                                       |
| h $\beta$ <sub>2</sub> AR | Receptor $\beta$ 2 adrenérgico de humano  |
| hA <sub>2</sub> A         | Receptor de adenosina A2A humano  |
| hD <sub>1</sub>           | Receptor dopaminérgico de humano D <sub>1</sub>                                     |
| hD <sub>1</sub> _SS       | Modelo de receptor dopaminérgico D <sub>1</sub> humano con un puente de disulfuro   |
| hD <sub>1</sub> _2SS      | Modelo de receptor dopaminérgico D <sub>1</sub> humano con dos puentes de disulfuro |
| hD <sub>2</sub>           | Receptor dopaminérgico de humano D <sub>2</sub>                                     |
| hD <sub>3</sub>           | Receptor dopaminérgico de humano D <sub>1</sub>                                     |
| hH <sub>1</sub>           | Receptor histamínico 1 de humano  |
| hM <sub>2</sub>           | Receptor muscarínico 2 de humano  |
| HOBt                      | Hidroxibenzotriazol   |
| HPLC                      | “High performance liquid chromatography”  |
| IC <sub>50</sub>          | Concentración de sustancia que inhibe el 50% de una función                         |
| Integ.                    | Integración   |
| IR                        | Infrarojo   |
| K <sub>i</sub>            | Constante de inhibición   |
| M <sup>+</sup>            | Ión molecular   |
| MeCN                      | Acetonitrilo  |
| MeOH                      | Metanol   |
| MEM                       | 2-metoxietoximetilo   |

|                    |   |
|--------------------|---|
| MOM                | Metoximetilo  |
| Mult.              | Multiplicidad   |
| <i>m/z</i>         | Relación masa/carga   |
| NBS                | <i>N</i> -bromosuccinimida  |
| NCS                | <i>N</i> -clorosuccinimida  |
| PDB                | Protein data bank   |
| POPC               | 1-palmitoil-2-oleoilfosfatilcolina                                  |
| P-S                | Pictet-Spengler   |
| QSAR               | “Quantitative structure-activity relationship”                      |
| RD                 | Receptores dopaminérgicos   |
| RMN <sup>1</sup> H | Resonancia magnética nuclear de protones                            |
| RMSD               | “Root-mean-square deviation” ( <i>desviación cuadrática media</i> ) |
| SAR                | “Structure-activity relationship”                                   |
| S <sub>Ar</sub> E  | Sustitución aromática electrofílica                                 |
| S <sub>Ar</sub> N  | Sustitución aromática nucleofílica                                  |
| SNC                | Sistema nervioso central  |
| SNP                | Sistema nervioso periférico   |
| β <sub>1</sub> AR  | Receptor Beta 1 adrenergico de pavo                                 |
| TBA-Br             | Bromuro de Tetrabutilamonio   |
| TEBA               | Tribenziletilamonio   |
| TFA                | Ácido trifluoroacético  |
| THF                | Tetrahidrofurano  |
| TM                 | Transmembrana   |
| t <sub>r</sub>     | Tiempo de retención   |
| UV                 | Ultra-violeta   |



## Aminoácidos

|          |                             |
|----------|-----------------------------|
| <b>A</b> | Alanina                     |
| <b>C</b> | Cisteína                    |
| <b>D</b> | Ácido aspártico o aspartato |
| <b>E</b> | Ácido glutámico o glutamato |
| <b>F</b> | Fenilalanina                |
| <b>G</b> | Glicina                     |
| <b>H</b> | Histidina                   |
| <b>I</b> | Isoleucina                  |
| <b>K</b> | Lisina                      |
| <b>L</b> | Leucina                     |
| <b>M</b> | Metionina                   |
| <b>N</b> | Asparagina                  |
| <b>P</b> | Prolina                     |
| <b>Q</b> | Glutamina                   |
| <b>R</b> | Arginina                    |
| <b>S</b> | Serina                      |
| <b>T</b> | Treonina                    |
| <b>V</b> | Valina                      |
| <b>W</b> | Triptófano                  |
| <b>Y</b> | Tirosina                    |

## Resumen

En el marco de la búsqueda de nuevas moléculas con actividad en los receptores de dopamina se construyó un modelo tridimensional de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> humanos como representantes de las subfamilias D<sub>1</sub>-like y D<sub>2</sub>-like respectivamente. Se propusieron estructuras moleculares basadas en el esqueleto de la 3-metoxidibenz[*d,g*]acecina (3MOD, molécula con actividad antagonista en el hD<sub>1</sub>) esperando que presentaran buena afinidad por los hD<sub>1</sub> y/o fuesen selectivas por el hD<sub>1</sub> con respecto al hD<sub>2</sub>. Para ello se propuso introducir halógenos en el C-4 para potenciar la afinidad por medio de interacciones favorables incluyendo un eventual puente de halógeno, grupos aromáticos en el C-10 y en el C-11, para favorecer la afinidad mediante interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$ , y grupos electrón-atractores aceptores de puente de hidrógeno en el C-10, para potenciar la selectividad en el hD<sub>1</sub> por sobre el hD<sub>2</sub> por interacciones selectivas con residuos no conservados en el hD<sub>2</sub>.

El efecto de la inclusión de halógenos se evaluó simulando el sistema 3-halógenoboldina/hD<sub>1</sub> cuyas afinidades ( $K_i$ ) eran conocidas. Los resultados mostraron que si bien los programas de simulación molecular reconocen la presencia del halógeno y correlacionan las  $K_i$  de las 3-halógenoboldinas con sus energías de acoplamiento, no se puede determinar con los resultados obtenidos si los aumentos de afinidad se deben a puentes de halógenos o al incremento de interacciones hidrofóbicas de la molécula.

Se sintetizaron los derivados 4-cloro3MOD y 4-bromo3MOD. Sus  $K_i$  obtenidas en los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> mostraron un leve aumento en comparación con el análogo no halogenado y un aumento de la selectividad en 9 veces por el D<sub>1</sub> con respecto al D<sub>2</sub> en el caso del 4-bromo3MOD. En el acoplamiento molecular se observó que los derivados posicionan el halógeno en el C-4 hacia un residuo no conservado (S(C)3.36), con el cual podrían interactuar por un puente de hidrógeno y/o halógeno.

También se obtuvieron los derivados 12-cloroescoulerina y 12-bromoescoulerina en función de la búsqueda de nuevas moléculas con las cuales estandarizar la posible interacción con los RD por puentes de halógenos mediante técnicas de simulación molecular. La comparación de las constantes de afinidad calculadas en los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> para 12-cloroescoulerina y 12-bromoescoulerina no mostraron diferencia entre ellas que fueran atribuibles a la presencia de un puente de halógeno.

El intento de obtener los nuevos derivados de 3MOD modificados en el C-10 y en el C-11 fracasó en su primer objetivo, pero condujeron a la obtención de una nueva molécula inesperada, 14-cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina con un rendimiento de 87%, para lo cual se propuso un mecanismo novedoso.

## Abstract

In a framework aiming to discover new molecules with affinity for dopamine receptors, three-dimensional model of the human D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors (hD<sub>1</sub> and hD<sub>2</sub> respectively) were built as representatives of the D1-like and D2-like families, respectively. The structures of new molecules were proposed based on the structure of the hD<sub>1</sub> antagonist 3-methoxydibenz[*d,g*]azecine (3MOD). The changes include halogenations at C-4 to maximize their affinity by a potential halogen bridge interaction, an aromatic group at C-10 or C-11 to increase the affinity by  $\pi$ - $\pi$  interaction, and an electron withdrawing, hydrogen bonding acceptor group in C-10 to increase selectivity for the hD<sub>1</sub> over the hD<sub>2</sub> by selective interactions with non-conserved residues.

The existence of the suggested halogen bonding interaction was evaluated by molecular simulation of the 3-haloboldine/hD<sub>1</sub>R system for which the affinity constants ( $K_i$ ) were known. The result show that the computational programs used read the presence of halogen but do not clarify if the increased affinity is due to halogen bonds or to increased hydrophobic interactions with the molecules.

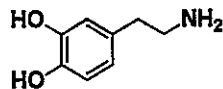
4-Chloro3MOD and the 4-bromo3MOD were synthesized. Their  $K_i$  values at hD<sub>1</sub> and hD<sub>2</sub> showed slightly enhanced affinity by hD<sub>1</sub>, and in the case of 4-bromo3MOD the selectivity for the hD<sub>1</sub> over the hD<sub>2</sub> was increased ninefold. Docking experiments show that these derivatives locates their C-4 halogen atom towards non-conserved residue (S(C)3.36) in these receptors with which they might interact *via* a hydrogen and/or a halogen bond.

12-chloroecoulerine and the 12-bromoecoulerine were also synthesized looking for molecules that might serve to standardize computational modeling of possible interactions with DR via halogen bond. Their calculated  $K_i$  of 12-chloroecoulerine and the 12-bromoecoulerine showed no differences attributable to the presence of a halogen bond.

Synthetic attempts to obtain the proposed new C-10 or C-11 modified derivatives of 3MOD failed in their objective, but led to the formation of an unexpected new molecule, 14-chloro-3-methoxy-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenz[*d,g*]azecine in 87% yield, for which a novel mechanism was proposed.

## Introducción

Los receptores dopaminérgicos (RD) son receptores neuronales ubicados en diferentes partes del organismo que se activan en presencia de dopamina ((DA), **Figura 1**).



**Figura 1.** Neurotransmisor dopamina (DA).

Estructuralmente los RD se clasifican como GPCR, es decir proteínas de membrana acoplados a proteínas G (Hardman y col., 1995; Kalant y Roschlau, 1998). Los cinco tipos de RD que se conocen (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> y D<sub>5</sub>), fueron descubiertos a lo largo de las décadas del '70 y del '80, en gran parte gracias al desarrollo de técnicas de clonación y amplificación de ADN (Gingrich y Caron, 1993). La clasificación de estos receptores se basa principalmente en sus propiedades bioquímicas determinadas por el tipo de proteína G al cual están acoplados, lo que los divide en dos familias: "D<sub>1</sub>-like" y "D<sub>2</sub>-like" (Kebabian y Calne, 1979). La familia "D<sub>1</sub>-like", compuesta por los RD D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, se caracteriza por interactuar con el complejo G<sub>s</sub> que estimula la adenilatociclasa y por ende la síntesis intracelular del adenosilmonofosfato cíclico (AMP-cíclico). En cambio la familia "D<sub>2</sub>-like" (constituida por D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>) interactúa con la proteína G<sub>i/o</sub>, que de acuerdo al tipo de complejo presente puede inhibir el efector adenilatociclasa y/o bloquear canales de calcio junto con la apertura de canales de potasio (Hardman y col., 1995; Kalant y Roschlau, 1998).

Los RD, en el organismo de los mamíferos, han sido encontrados tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico (SNP) (Hardman y col., 1995). En el SNC

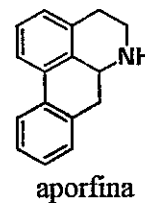
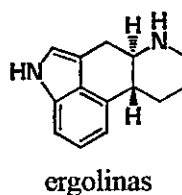
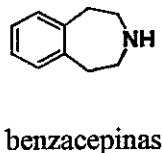
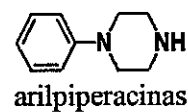
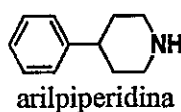
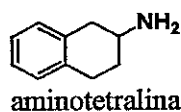
se ha visto que en la corteza cerebral y en el sistema límbico están presentes todos los RD, pero entre ellos predominan los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Freneau y col., 1991; Weiner y col., 1991). Además se ha encontrado la presencia de D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> en el cuerpo estriado. En el SNP se han hallado: D<sub>2</sub>, D<sub>4</sub> y D<sub>5</sub> en el sistema cardiovascular; D<sub>3</sub> y D<sub>5</sub> en el riñón; y D<sub>5</sub> en el tracto gastrointestinal (Jose y col., 1992; Amenta y col., 1995; Vaughan y col., 2000).

El neurotransmisor DA se ha asociado desde la década del 60 a diferentes desórdenes mentales (Seeman, 2010). A medida que transcurrieron los años se descubrieron los distintos tipos de RD y desde ese momento, hasta el día de hoy, se les han tratado de asociar los diferentes desórdenes relacionados con dopamina. Dentro de estos desórdenes encontramos: adicciones, esquizofrenia, depresión y enfermedad de Parkinson (Corominas y col.; Burt y col., 1977; Brooks, 2000; Gershon y col., 2007; Carati y Schenk, 2011). En las adicciones se ha visto que los receptores “D<sub>1</sub>-like” y “D<sub>2</sub>-like” están involucrados en diferentes etapas de estos trastornos y que actúan en diferente grado de acuerdo al tipo de adicción (Corominas y col.; Carati y Schenk, 2011). En la esquizofrenia el tratamiento se realiza mayormente con antagonistas de la familia “D<sub>2</sub>-like” (Burt y col., 1977), pero también se ha observado una respuesta positiva en el tratamiento con antagonistas de tipo “D<sub>1</sub>-like” (McQuade y col., 1991) y ligandos de receptores de serotonina (5-hidroxitriptamina) (De Oliveira y Juruena, 2006). En la depresión se ha determinado que una activación de los receptores de tipo “D<sub>2</sub>-like” actuaría eficazmente como antidepresivo (Gershon y col., 2007). Por último, esta misma familia estaría predominantemente involucrada en la enfermedad de Parkinson (Brooks, 2000).

La relación existente entre los desórdenes mentales y neurológicos comentados anteriormente y los RD ha promovido la síntesis de compuestos con el fin de estudiar la bioquímica de ellos, como también de desarrollar fármacos que reduzcan sus síntomas, ya que actualmente los

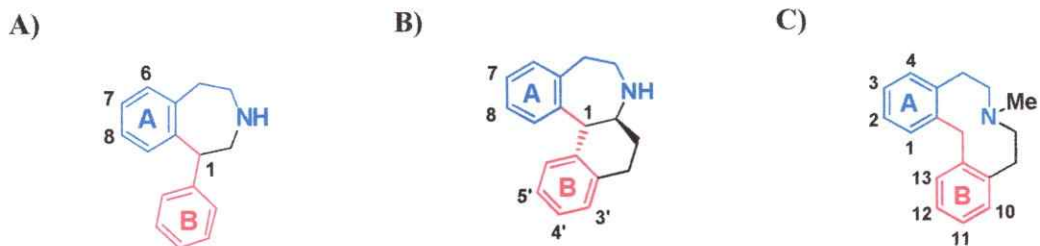
productos utilizados contra estos trastornos no cumplen a cabalidad su función. Un ejemplo de esto es lo que sucede en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. (Gershon y col., 2007) En esta enfermedad el fármaco más eficaz líder para su tratamiento es L-dopa ((S)-3,4-dihidroxifenilalanina) que es el principal precursor inmediato en la ruta de síntesis endógena de la dopamina (Hardman y col., 1995; Kalant y Roschlau, 1998). En un principio la utilización de este aminoácido hace disminuir los síntomas motores como la rigidez, disquinesia y aquinesia, pero a medida que avanza el tratamiento se vuelven a desarrollar los movimientos involuntarios, patología conocida como disquinesia inducida por L-dopa (Gershon y col., 2007).

Los compuestos con actividad dopaminérgica que se han sintetizado se basan en gran parte en unas pocas estructuras de moléculas bases, tales como aminotetralinas, arilpiperidinas, arilpiperacinas, benzacepinas, ergolinas y aporfina (Figura 2). Además, aparte de sustituciones comunes (como halogenación y metilación) a éstas se les agregan en ciertos casos residuos de indoles, tiazoles, quinolinas e indeno, entre otros (Zhang y col., 2007). De acuerdo a los estudios de las moléculas existentes y sus respectivas afinidades y actividades se han desarrollado compuestos líderes que son utilizados como base para nuevas moléculas, tal es el caso de las benzacepinas.

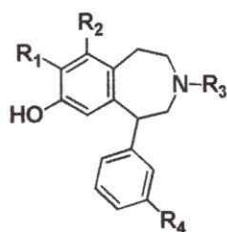


**Figura 2.** Estructuras de moléculas base de compuestos con actividad dopaminérgica.

Los derivados de benzacepinas ampliamente utilizados en la investigación bioquímica de los RD son las 1-fenilbenzacepinas (en rigor, 1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-benzacepinas, **Figura 3 A**). El compuesto denominado SKF-388393 (**1a**, **Figura 4**, **Tabla 1**) es el primer agonista selectivo para D<sub>1</sub> ( $K_{i(D1-like)} = 151$  nM;  $K_{i(D2-like)} = 2364$  nM) (Setler y col., 1978; Neumeyer y col., 1991; Clark y col., 2011) y su modificación por sustitución del hidroxilo en C-7 por un cloro dio paso al desarrollo del antagonista selectivo SCH-23390 (**Tabla 1**, **Figura 4**,  $K_{i(D1)} = 0,12$  nM;  $K_{i(D2)} = 1210$  nM) que en la actualidad es el antagonista líder utilizado como radioligando (Iorio y col., 1983; Neumeyer y col., 2003). Amplia ha sido la diversidad de los sustituyentes que se han incorporado en estas dos estructuras. En la **Tabla 1** se resumen, junto a las constantes de afinidad, algunos de los derivados obtenidos en las últimas décadas (Neumeyer y col., 2003; Wu y col., 2005; Zhang y col., 2008; Zhang y col., 2009; Qiang y col., 2010). En función de mejorar la eficacia y la estabilidad metabólica de SCH-23390 se rigidizó el segmento aromático unido a C-1 generando una nueva familia de moléculas denominadas benzonaftacepinas (**Figura 3 B**) (Chipkin y col., 1988; Qiang y col., 2010). El líder de esta nueva familia, SCH-39166 (**2a**), presentó afinidades del orden nM para D<sub>1</sub> y  $\mu$ M para D<sub>2</sub> (Berger y col., 1989). Veinte años después surgieron nuevos derivados de SCH-39166 con variaciones en la posición 4' del anillo B (**Tabla 2**, **Figura 4**) donde se observó que la inclusión de grupos como mesilamido y etilurea incrementan la selectividad en D<sub>1</sub> por sobre D<sub>2</sub> desde 800 a 6000 veces (Qiang y col., 2010). Otra estructura análoga a los derivados de 1-fenilbenzacepina es la 5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina que presenta al igual que ellas dos centros aromáticos y una amina cíclica alifática (**Figura 3 C**), con la diferencia importante de que el ciclo de diez miembros le confiere una flexibilidad conformacional de la que carecen las otras estructuras.



**Figura 3.** Esqueletos moleculares de: A) 1-fenilbenzacepinas, B) benzonaftecepinas y C) 5,6,7,8,9,14-hexahidro-dibenz[*d,g*]acecinas.

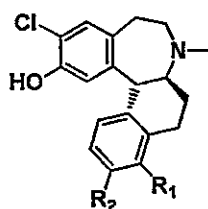


**Figura 4.** 1-Fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-benzacepinas y la posición de sus modificaciones detalladas en la **Tabla 1**.



**Tabla 1.** Afinidades en los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> asociadas a derivados de 1-fenilbencepina

| Nombre         | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>                     | R <sub>4</sub> | D <sub>1</sub> | D <sub>2</sub> |
|----------------|----------------|----------------|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1a, SKF-388393 | OH             | H              | H                                  | H              | 1,1            | 160/8800       |
| 1b             | OH             | Cl             | H                                  | H              | 7,0            | 310/8000       |
| 1c             | OH             | Br             | H                                  | H              | 12             | 39/2000        |
| 1d             | OH             | H              | CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub> | H              | 25             | 10000          |
| 1e             | OH             | Cl             | CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub> | H              | 15             | 122            |
| 1f             | OH             | Br             | CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub> | H              | 50             | 174            |
| 1g             | OH             | F              | CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub> | H              | 100            | 137            |
| 1h             | OH             | Me             | CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub> | H              | 400            | 10000          |
| 1i             | OH             | Br             | CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub> | Me             | 0,11 ± 0,03    | 83,8 ± 7,8     |
| 1j             | OH             | Br             | Me                                 | Me             | 0,19 ± 0,02    | 440 ± 67       |
| 1k             | OH             | Br             | H                                  | Me             | 4,41 ± 0,28    | 1.072 ± 221    |
| 1l             | OH             | Cl             | Me                                 | Me             | 21,3 ± 2,2     | 2.136 ± 573    |
| 1m             | H              | Cl             | Me                                 | Me             | >10.000        | ----           |
| 1n, SCH-23390  | Cl             | H              | Me                                 | H              | 0,4 ± 0,1      | 648 ± 39       |



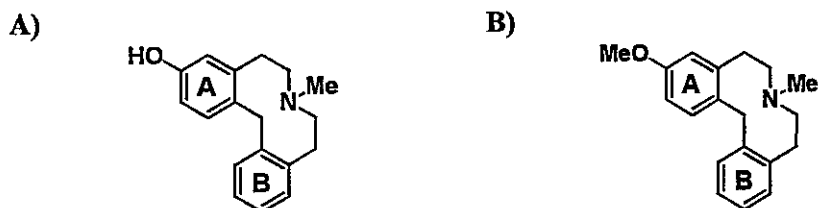
**Figura 5.** Estructura de SCH-39166 y la posición de sus modificaciones detalladas en **Tabla 2.**

**Tabla 2.** Afinidades en los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> asociadas a derivados de SCH-39166.

| Nombre        | R <sub>1</sub>       | R <sub>2</sub>      | D <sub>1</sub> | D <sub>2</sub> |
|---------------|----------------------|---------------------|----------------|----------------|
| 2a, SCH-39166 | H                    | H                   | 1,2            | 980            |
| 2b            | CH <sub>2</sub> OH   | H                   | 3              | 1.647          |
| 2c            | CH=N-OBn             | H                   | 0,2            | 69             |
| 2d            | CH=N-OPh             | H                   | 1,0            | 124            |
| 2e            | CH=N-OEt             | H                   | 1,8            | 217            |
| 2f            | Ph                   | H                   | 0,2            | 79             |
| 2g            | Ph-3OCF <sub>3</sub> | H                   | 2,3            | 1612           |
| 2h            | NSO <sub>2</sub> Me  | H                   | 4,7            | 1000           |
| 2i            | H                    | NSO <sub>2</sub> Me | 0,5            | 3000           |
| 2j            | NCONHEt              | H                   | 2,4            | 900            |
| 2k            | H                    | NCONHEt             | 1,5            | 6000           |
| 2l            | CO <sub>2</sub> Et   | H                   | 2,3            | 500            |
| 2m            | H                    | CO <sub>2</sub> Et  | 3,3            | 3900           |

El esqueleto de la 5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (Figura 3 C) fue desarrollado recientemente y han sido muy pocos los derivados surgidos desde su estructura (Hoefgen y col., 2006; Lehmann y col., 2006; Mohr y col., 2006; Enzensperger y col., 2007; Schulze y col., 2009; Robaa y col., 2011). Las modificaciones principales están presentes en uno solo de sus anillos aromáticos e incluyen: los sustituyentes hidroxilo, metoxilo, amino, metilendioxi y cloro como también el reemplazo de un anillo bencénico por anillos de tipo: indol, tiofeno y benzotiofeno. En cuanto al segundo anillo aromático solo se conocen dos derivados que incluyen un grupo hidroxilo y metoxilo en C-3 y C-11 a la vez (Mohr y col., 2006). Todos los derivados desarrollados hasta el momento actúan como antagonistas para los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> y no presentan selectividad útil entre ellos. LE-404 (Figura 6 A) es considerado como el líder de la familia en cuanto a su afinidad ( $K_{i(D1)} = 0,39$  nM;  $K_{i(D2)} = 17,5$  nM) pero los estudios *in vivo* han mostrado que presenta una baja biodisponibilidad atribuida al grupo hidroxilo en su estructura

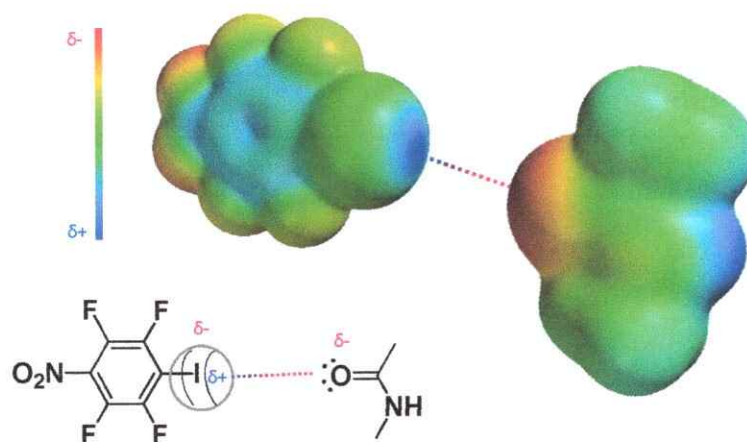
(Robaa y col., 2011). Es así como su homólogo 3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (3MOD, **Figura 6 B**) de afinidades un poco menores ( $K_{i(D1)} = 28,5$  nM;  $K_{i(D2)} = 13,0$  nM) potencialmente podría considerarse para realizar modificaciones estructurales sobre él.



**Figura 6.** Derivados de 5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina: **A)** LE-404 y **B)** 3MOD.

Para diseñar nuevas moléculas de forma racional se pueden utilizar técnicas como SAR (“structure-activity relationship”), QSAR (“quantitative structure-activity relationship”), 3D-QSAR (CoMFA “comparative molecular field analysis” y CoMSia “comparative molecular similarity analysis”) y acoplamiento molecular (“Docking”). Las tres primeras técnicas se encuentran limitadas por la necesidad de conocer un gran número de derivados de la molécula a modificar. El acoplamiento molecular, a diferencia de las técnicas anteriores, es capaz de relacionar la estructura y composición aminoacídica del sitio de interacción del blanco terapéutico con la estructura del compuesto a modificar. El análisis de las interacciones permite proponer modificaciones en un ligando que potencien la afinidad y/o actividad por medio de interacciones con aminoácidos específicos dentro de la cavidad. Las interacciones que se potencian comúnmente son las de tipo iónico y/o de van der Waals y dentro de ellas las de puente de hidrógeno e hidrofóbicas. Sin embargo existe otra interacción de van der Waals que puede estar presente y ser la razón del incremento de la actividad pero que no es comúnmente considerada: nos referimos a los puentes de halógeno.

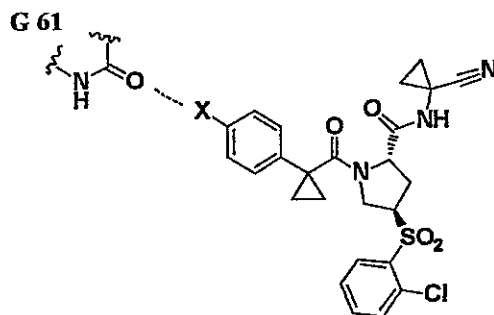
Los puentes de halógeno son un tipo de interacción que ha sido considerada recién desde principios de los años '90 en diferentes ámbitos tales como reconocimiento molecular, ensamble molecular y química supramolecular (Metrangolo y col., 2008); y solo recientemente se ha visto involucrado en sistemas biológicos (Voth y col., 2007; Lu y col., 2009; Hardegger y col., 2011). Esta interacción se dio a conocer tempranamente en el discurso de la ceremonia de entrega del premio Nobel de química a Odd Hassel, en el año 1970 (Hassel, 1970). En ésta el premiado expuso los resultados de un trabajo publicado en 1954 que no fue uno de los que motivaron la entrega del galardón, y que daba a conocer la existencia de un complejo entre el bromo molecular y los oxígenos del 1,4- dioxano, donde la distancia entre los átomos de bromo y oxígeno era menor a la suma sus radios de van der Waals (Hassel y Hvosllef, 1954; Hassel, 1970). En ese instante Hassel había denominado lo observado como “enlace de transferencia de carga interatómica”, pero no fue hasta el año 1978 que Dumas y col. le asignaron el nombre de puente de halógeno (Dumas y col., 1987). Actualmente se conoce como una interacción no covalente entre un átomo de halógeno (Br, I, en menor proporción Cl y casi nunca F) en una molécula y un átomo (O, N y S) o un grupo (alqueno, alquino o aromático) electrodonor vecino (Metrangolo y col., 2008). Esta interacción, fuertemente direccional, presenta un ángulo de unión que varía entre 160° y 180° (Politzer y col., 2006). Lu y col. (2009) estudiaron, por medio de técnicas computacionales, la energía de la interacción entre halógeno y oxígeno en varios sistemas de proteína-ligando (obtenidos desde la base de datos de proteínas “PDB”) que presentaban distancias internucleares menores a la suma de los radios de van der Waals. En este trabajo se observó que la energía de este tipo de interacción es comparable en magnitud a la un puente de hidrógeno común y que el orden de la atenuación de esta está dado por:  $H \approx I > Br > Cl$ . En la **Figura 7** se muestra una representación de la interacción por puente de halógeno.



**Figura 7.** Representación de la interacción por puente de halógeno entre el donador de halógeno 1,2,4,5-tetrafluoro-6-nitro-3-yodoobenzeno y el aceptor de halógeno *N*-metilacetamida. Arriba, representación de la interacción por medio de potencial electrostático.

El primer estudio sistemático de la interacción por puente de halógeno en sistemas biológicos fue realizado por Hardegger y col. En el observaron, por medio de difracción de rayos X, la formación de un puente de halógeno en la estructura cristalina de la catepsina L humana cristalizada en presencia de un inhibidor clorado. Este puente se encontraba entre el cloro de un segmento 4-clorofenilo del inhibidor, y el grupo C=O de un enlace peptídico (**Figura 8**). Conjuntamente se evaluó la  $IC_{50}$  de una serie de compuestos con diversos sustituyentes en la posición 4 del grupo fenilo, donde se observó que su valor para el compuesto clorado era 13 veces menor que el del compuesto no sustituido en dicha posición. A medida que se aumentaba el tamaño del halógeno, en la misma serie de compuestos, su valor disminuía aun más ( $IC_{50(H)} = 0,29 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50(Cl)} = 0,022 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50(Br)} = 0,012 \mu\text{M}$  y  $IC_{50(I)} = 0,0065 \mu\text{M}$ ). Además, en el mismo estudio, se evaluó la afinidad de los compuestos sustituidos con flúor y con metilo, grupo de lipofilia apenas inferior a Cl ( $IC_{50(F)} = 0,34 \mu\text{M}$  e  $IC_{50(Me)} = 0,13 \mu\text{M}$ ) observándose que no

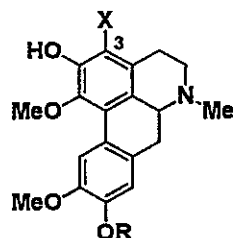
mejora significativamente la afinidad del compuesto con respecto al no sustituido, lo que concuerda con la presencia o ausencia de la interacción por puente de halógeno. En algunos casos esto también fue confirmado cristalográficamente (código de tres letras PDB: 2xu1, 2xu3, 2xu4, 2xu5) (Hardegger y col., 2011).



**Figura 8.** Derivado halogenado ensayado por Hardegger y col. (X representa el halógeno). Por medio de una línea punteada roja se representa la interacción por puente de halógeno con el oxígeno carbonílico de glicina G61 de la catepsina L humana.

El estudio por medio de acoplamiento molecular para proponer maneras de potenciar la afinidad de nuevos ligandos aprovechando interacciones del tipo puentes de halógeno se encuentra aún en una etapa preliminar, dado que hay pocas metodologías computacionales desarrolladas con este fin y su empleo puede ser poco confiable. Kolář y col (2013), realizaron el estudio de la interacción por puente de halógeno en 92 estructuras cristalinas ligandohalogenado-receptor por medio de dimulación molecular. Por ello se propone que el estudio de esta interacción por medio de la correlación entre resultados de  $K_i$  asociados a la presencia de un puente de halógeno y “docking” podría servir a modo de estandarización para un posterior diseño de fármacos. En el caso del RD, el estudio propuesto se podría realizar a partir de investigaciones anteriores que sugieren por medio de las constantes de afinidad que en la interacción ligando-RD podría

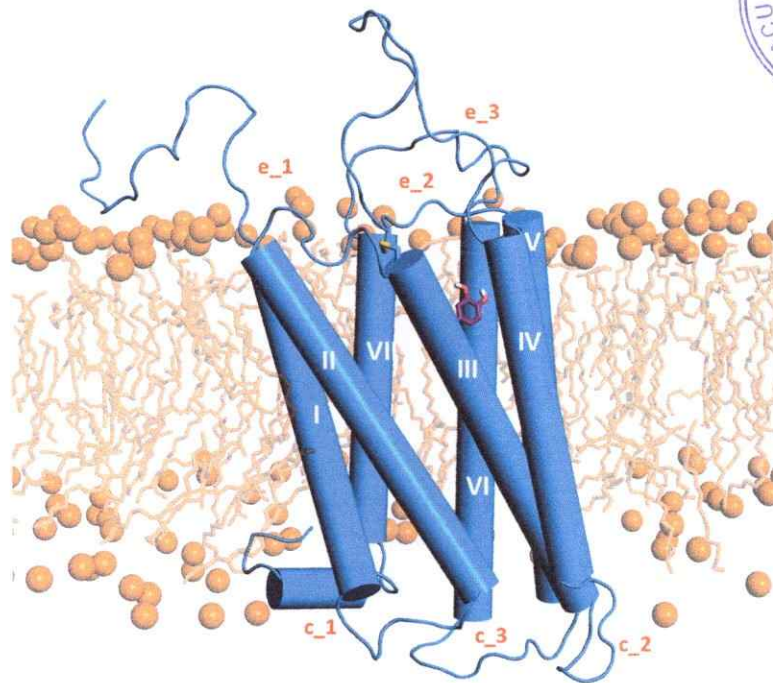
involucrar un puente de halógeno. En ellas se realizó la síntesis y posterior evaluación de la afinidad dopaminérgica “D1-like” y “D2-like” (así como también de la afinidad  $\alpha_{1A}$ -adrenérgica (Martinez y col., 1999)) de derivados de la boldina halogenados en la posición 3 (**Figura 9**), donde se observó que existía un aumento considerable de la afinidad “D1-like” al pasar de la boldina no sustituida ( $IC_{50(H)} = 0,4 \mu M$ ) a las halogenadas y además este incremento se encontraba relacionado con el tamaño molecular de los halógenos ( $IC_{50(Cl)} = 0,081 \mu M$ ,  $IC_{50(Br)} = 0,066 \mu M$  y  $IC_{50(I)} = 0,003 \mu M$ ). Además se observó que derivados de predicentrina, halogenados en la posición 3 (**Figura 9**) también incrementaban su afinidad hacia los receptores “D1-like” al encontrarse sustituido este carbono por un halógeno ( $K_{i(H)} = 0,243 \mu M$ ,  $K_{i(Br)} = 0,015 \mu M$  y  $K_{i(I)} = 0,006 \mu M$ ) (Sobarzo-Sánchez y col., 2000; Asencio y col., 2005).



**Figura 9.** Boldina (R = OH; X = H), predicentrina (R = Me; X = H) y sus derivados halogenados en el C-3.

El estudio de las interacciones ligando-proteína requiere del conocimiento de la estructura tridimensional de esta última. Los RD, como se mencionó, son GPCR y estructuralmente se caracterizan por estar constituidos por 7 dominios transmembranares (TM)  $\alpha$ -helicoidales unidos por tres lazos intracelulares y tres lazos extracelulares y un sitio de unión ligando-proteína ubicado entre los TM hacia el espacio extracelular (**Figura 10**). Los TM presentan alta homología entre las distintas familias de RD (42% - 46%) (Bahena-Trujillo y col., 2000), como también entre los integrantes de cada una. En el caso de los receptores  $D_1$  y  $D_5$  esta homología

alcanza un 80% y para la familia “D2-like” esta alcanza un valor de: 75% entre D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> y 53% entre D<sub>2</sub> y D<sub>4</sub> (Missale y col., 1998). En el sitio activo existe una alta identidad aminoacídica entre los residuos que han sido catalogados como cruciales para la activación del receptor. Este es el caso de un aspartato (D) ubicado en TM III (D3.32 según la nomenclatura de Ballesteros y Weinstein ZY.XX ver Anexo A, p. 172 (Ballesteros y Weinstein, 1995)) y tres serinas (S) ubicadas en el dominio TM V: S5.42, S5.43 y S5.46. Por otro lado se ha estudiado la presencia de un puente de disulfuro entre cisteínas (C) del lazo extracelular 2 (e<sub>2</sub>) y el dominio TM III, que sería crucial en la integridad estructural y función de muchas GPCR (Karnik y col., 2003; Moreira y Shi, 2010) .



**Figura 10.** Representación estructural del receptor D<sub>1</sub>. El receptor (en celeste) se encuentra inmerso en una bicapa lipídica coloreada suavemente en tonos anaranjados. Los siete dominios de TM se encuentran identificados con números romanos. Los lazos extracelulares o citoplasmáticos se identifican con e\_ o c\_ respectivamente y se encuentran numerados del 1 al 3. El puente de disulfuro se señala en amarillo y el ligando DA en morado.



En la actualidad existe un número de estructuras de proteínas conocidas mucho mayor con respecto a años anteriores, encontrándose dentro de ellas la estructura del RD  $D_3$ . Lamentablemente  $D_3$  no es uno de los receptores representativos de alguna de las dos subfamilias de RD que existen, lugar que toman los receptores  $D_1$  y  $D_2$ , ya que estos son los que presentan una mayor densidad dentro del sistema nervioso central y por lo tanto son los asociados a un mayor número de desórdenes mentales. Para desarrollar el estudio de cómo interaccionaría un ligando con un blanco aún no conocido tridimensionalmente se debe construir un modelo de él, en este caso los receptores  $D_1$  y  $D_2$ . La construcción de modelos de los RD se ha realizado comúnmente desde la estructura cristalina de la rodopsina de bovino (Moreira y Shi, 2010). En 2007 y 2008 fueron cristalizados por primera vez los receptores  $\beta_2$  y  $\beta_1$ -adrenérgicos, lo que llevó a la construcción de modelos más confiables de los RD, pero recientemente fue cristalizado el primer RD, el cual fue del tipo  $D_3$  humano (Rasmussen y col., 2007; Warne y col., 2008; Chien y col., 2010). En este estudio se observaron varias situaciones: una de ellas es la existencia del puente de disulfuro característico de GPCR nombrado anteriormente, pero además se observa otro puente entre los residuos C355 y C358 en el tercer lazo extracelular. También se da cuenta de que el sitio de unión involucra los dominios de las TM II, III, V, VI y VII y el lazo extracelular 2. Todo lo anterior obliga a utilizar esta nueva información en la construcción de los modelos de RD.

## Hipótesis

El estudio estructural de los receptores dopaminérgicos permitirá por medio de técnicas de simulación molecular proponer derivados de 3-metoxidibenz[*d,g*]acecina que potencien la afinidad y/o selectividad por el receptor D<sub>1</sub>.

La síntesis de los nuevos derivados se puede realizar a través de la ruta sintética informada para 3-metoxidibenz[*d,g*]acecina.

## Objetivos

### Objetivo general

Estudiar la características estructurales de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> y a partir de estas desarrollar nuevos derivados de 3-metoxidibenz[*d,g*]acecina con mayor afinidad y/o selectividad.

### Objetivos específicos

1. Construir modelos de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> humanos a partir de la estructura cristalina del receptor homólogo D<sub>3</sub>.
2. Realizar estudios de simulación molecular para diseñar nuevos derivados de 3-metoxidibenz[*d,g*]acecina que puedan presentar mayor afinidad y/o selectividad.
3. Realizar estudios de simulación molecular sobre la presencia de puentes de halógenos entre los receptores D<sub>1</sub> y derivados de boldina como también en otros compuestos que se sugiere que interaccionan a través de puente de halógeno con los receptores dopaminérgicos.
4. Sintetizar los derivados de dibenzacecina propuestos por los estudios de simulación molecular.
5. Sintetizar compuestos halogenados y alquilados faltantes en las otras familias que se crea que podrían interactuar con los receptores dopaminérgicos por medio de un puente de halógeno.
6. Caracterizar y validar la pureza de los compuestos sintetizados para su entrega al laboratorio que realizará la evaluación bioquímica de sus afinidades.

## Resultados y Discusión

### SIMULACIÓN MOLECULAR

#### Construcción de los modelos de los receptores dopaminérgicos (RD)

##### *Alineamiento Aminoacídico*

Los modelos tridimensionales de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> humanos (hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> respectivamente) se obtuvieron mediante modelamiento por homología. Inicialmente se realizó el alineamiento aminoacídico que se encuentra en el Anexo A p.173-4. Con él se obtuvo el porcentaje de identidad aminoacídica entre los receptores a modelar y los moldes (**Tabla 3**) observándose que el mejor molde para el hD<sub>1</sub> es el receptor β<sub>2</sub> adrenérgico humano (hβ<sub>2</sub>AR), con una identidad aminoacídica de 38,7% y para el hD<sub>2</sub> el receptor hD<sub>3</sub>, con una identidad aminoacídica de 47,8%, por lo cual ambos se utilizaron en la construcción de los modelos a través de Modeller. Uno de los receptores de tipo GPCR de monoaminas que no se integró en la elección del molde es el receptor β<sub>1</sub> adrenérgico de pavo (tβ<sub>1</sub>AR) ya que fue cristalizado con posterioridad al presente estudio (Huang y col., 2013).

Considerando que los GPCR presentan residuos de aminoácidos conservados que son importantes a nivel estructural y/o funcional (Karnik y col., 2003; Moreira y col., 2010), algunos de estos fueron definidos como puntos de referencia para establecer los segmentos a alinear. Dentro de estos residuos están; dos cisteínas (C), una en el inicio de la TM III y otra en una posición variable del lazo extracelular 2 (e\_2), el segmento DRY en el final de la TM III el cual ha sido descrito como relevante para el estado inactivo, y el conjunto de aminoácidos WxxPx en

la TM VI, donde se ha propuesto que triptófano (W) participa en el proceso de transducción de los GPCR (Lewis y col., 2006).

**Tabla 3.** Porcentaje de identidad aminoacídica entre receptores GPCR-A (potenciales moldes) y los receptores a modelar hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>.

|                 | bRh  | hβ <sub>2</sub> AR | tβ <sub>1</sub> AR | hA <sub>2</sub> A | hM <sub>2</sub> | hH <sub>1</sub> | hD <sub>3</sub> |
|-----------------|------|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| hD <sub>1</sub> | 20,5 | 38,7               | 41,3               | 29,7              | 33,3            | 31,6            | 36,9            |
| hD <sub>2</sub> | 19,7 | 29,7               | 29,1               | 27,1              | 26,8            | 26,9            | 47,8            |

*Construcción y validación de los modelos de los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>*

Para la obtención de las estructuras tridimensionales de los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>, por medio del programa Modeller (Shen y Sali, 2006; Melo y Sali, 2007) se debe definir explícitamente la existencia de puentes de disulfuro. Para ello se consideró que en un 90% los receptores GPCR se conserva un puente de disulfuro entre el extremo extracelular de la TM III y el lazo extracelular 2 (e<sub>2</sub>) (Karnik y col., 2003; Moreira y Shi, 2010). Así, de acuerdo al análisis realizado, se estableció que el puente de disulfuro en los modelos se presenta entre C3.25 y C186e<sub>2</sub> en el hD<sub>1</sub> y entre C3.25 y C182e<sub>2</sub> en el hD<sub>2</sub>.

De los 100 modelos generados fueron seleccionados 5 para cada receptor. La discriminación primaria de los modelos se basó en el criterio energético (valor del “DOPE Score”) entregado por Modeller (Tabla 4, (Shen y Sali, 2006)).

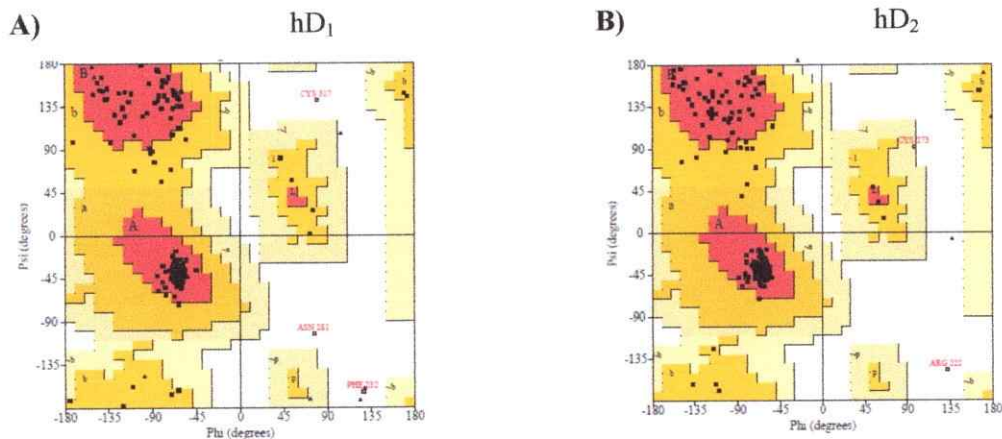
**Tabla 4.** Valores del “DOPE score” para los modelos seleccionados de hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>

| hD <sub>1</sub> |            | hD <sub>2</sub> |            |
|-----------------|------------|-----------------|------------|
| Nº Modelo       | DOPE score | Nº Modelo       | DOPE score |
| 5               | -38981     | 4               | -40038     |
| 11              | -39015     | 26              | -40023     |
| 26              | -39110     | 64              | -39983     |
| 31              | -39467     | 105             | -40033     |
| 35              | -39211     | 166             | -40006     |

Los modelos de los hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> fueron evaluados energéticamente y estereoquímicamente utilizando los programas ProSa (Wiederstein y Sippl, 2007) y PDBSum (Laskowski y col., 1997) respectivamente. Cabe mencionar que todos los resultados de esta evaluación se comparan con los estudios en las proteínas utilizadas como molde para construir los modelos. A continuación se describen los resultados obtenidos.

*Representaciones de Ramachandran obtenidos desde PDBSum.*

Las representaciones de Ramachandran fueron obtenidos para las estructuras cristalinas de los receptores utilizados como molde (Anexo A, p. 175) y para los modelos de menor DOPEscore de cada receptor (Figura 11 A y B). En el Anexo A, p. 175 además se encuentra una tabla resumen de los gráficos de Ramachandran de los 5 modelos seleccionados para cada receptor (Tabla 4), así como también el de las estructuras cristalinas.



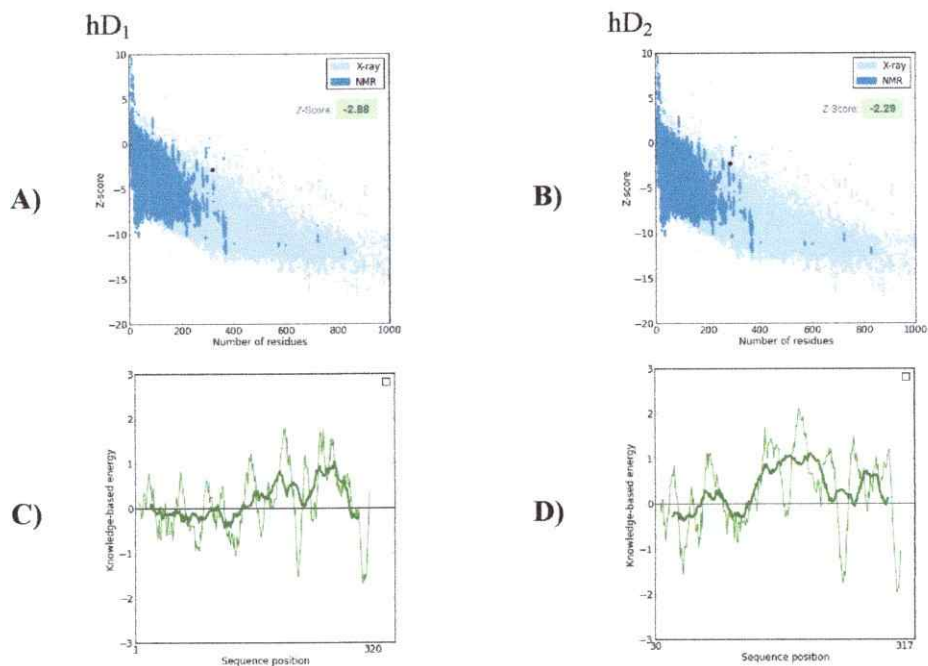
**Figura 11.** Representaciones de Ramachandran de los modelos escogidos de **A)** hD<sub>1</sub> y **B)** hD<sub>2</sub>.

En la **Figura 11** para ambos casos se puede observar que la mayoría de los residuos forman parte de estructuras terciarias de tipo  $\alpha$ -hélice concordando con lo que se conoce de los receptores del tipo GPCR (Hardman y col., 1995; Kalant y Roschlau, 1998; Xu y col., 2007). Solo los residuos localizados en los lazos extra e intracelulares poseerían una estructura secundaria aleatoria. Debido a que los lazos pueden o no tener una estructura secundaria determinada, los valores de los ángulos diedros “ $\psi$ ” y “ $\phi$ ” de estos segmentos no se han establecido para las estructuras secundarias que se definen en los gráficos de Ramachandran.

### *ProSa*

La validación energética de los modelos se realizó utilizando el programa ProSa (Wiederstein y Sippl, 2007), el cual entrega una descripción general de los modelos seleccionados en función de estructuras tridimensionales obtenidas experimentalmente (difracción de rayos X y/o RMN) y una descripción energética por segmento. El gráfico de “Z-score” versus número de residuos muestra (**Figura 12 A y B**) que tanto el modelo del hD<sub>1</sub> como el del hD<sub>2</sub> están en áreas

aceptables. Por otra parte, en el análisis de la energía del modelo (Knowledge-based energy) por segmento de aminoácidos (ventanas de 20 y 40 unidades) se observa (**Figura 12 C y D**) que existen zonas con valores de energía mayor a 0, que indican conformaciones desfavorecidas. Es importante mencionar que experimentalmente se tiene escasa información estructural de proteínas de membrana. Por ello se analizaron las estructuras cristalinas utilizadas como molde encontrándose que las representaciones gráficas presentan un comportamiento similar a los modelos del hD<sub>1</sub> y del hD<sub>2</sub>. En el Anexo A, p. 176 se encuentran los gráficos entregados por el sitio web Prosa para ambas estructuras cristalinas

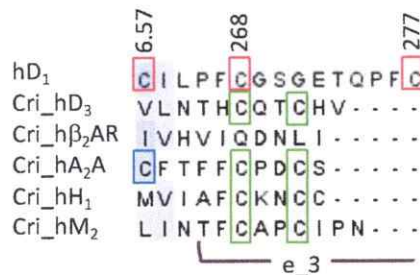


**Figura 12.** Gráficos obtenidos del sitio web ProSa. **A)** y **B)** Gráficos de “Z-score” calculados a partir de la base de datos de estructuras provenientes de difracción de Rx (azul claro) y RMN (azul oscuro). El valor obtenido para los modelos de los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> se destaca en negro. **C)** y **D)** Gráficos de “Knowledge-based energy” para los modelos de los hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> respectivamente.



### ¿Un segundo puente de disulfuro?

Es esta sección se estudió la posibilidad de un segundo puente de disulfuro en el segmento extracelular, ya que un segundo puente fue observado en algunas de las estructuras cristalinas utilizadas en la alineación de secuencias aminoacídicas (hD<sub>3</sub>, hM<sub>2</sub>, hA<sub>2</sub>A y hH<sub>1</sub>). Este se ubica en el lazo extracelular 3 (e<sub>3</sub>) en los hD<sub>3</sub>, hM<sub>2</sub> y hA<sub>2</sub>A y desplazado hacia la TM VI en el hH<sub>1</sub> (Anexo A, p. 177). En todos los receptores el segundo puente de disulfuro se forma entre cisteínas separadas por dos residuos aminoacídicos. El receptor hβ<sub>2</sub>AR no presenta un segundo puente disulfuro y tampoco las cisteínas disponibles para formarlo. La secuencia aminocídica del hD<sub>1</sub> presenta tres cisteínas disponibles en el e<sub>3</sub> que podrían potencialmente formar un puente disulfuro (**Figura 13**).



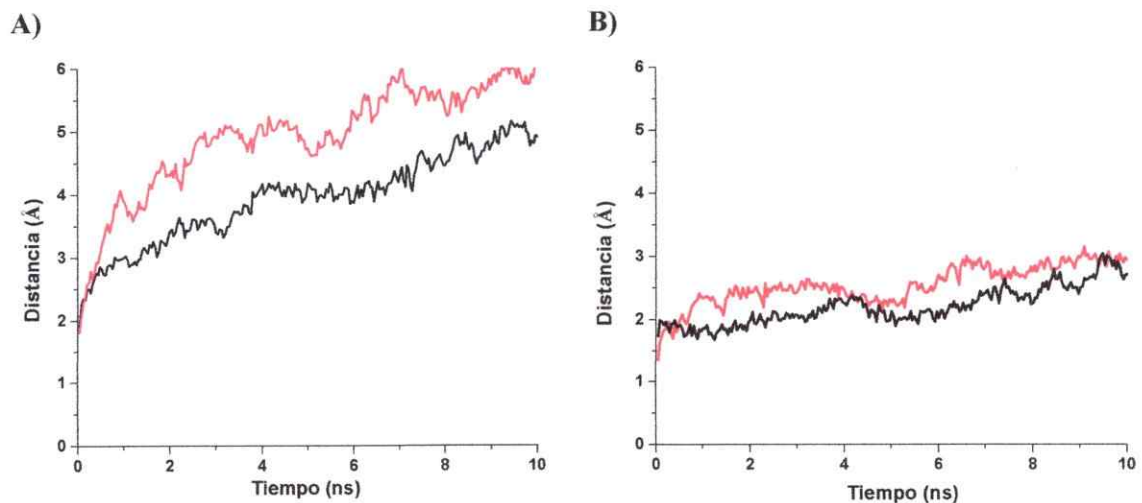
**Figura 13.** Alineación de las secuencias aminoacídicas del segmento del e<sub>3</sub> entre hD<sub>1</sub> y las estructuras cristalinas de hD<sub>3</sub>, hA<sub>2</sub>A, hH<sub>1</sub> y hM<sub>2</sub>. Enmarcadas en rojo, las cisteínas (C) disponibles en el hD<sub>1</sub> para construir el modelo del hD<sub>1</sub>\_2SS. En verde, las que forman el segundo puente de disulfuro observado en las estructuras cristalinas. En azul, la cisteína disponible en el hA<sub>2</sub>A que no participa en el segundo puente de disulfuro extracelular.

Una primera opción es considerar C268e<sub>3</sub> y C277e<sub>3</sub>, donde el puente se formaría en el centro del e<sub>3</sub>, al igual que las estructuras cristalinas de los hD<sub>3</sub>, hM<sub>2</sub> y hA<sub>2</sub>A, pero no con la distancia óptima observada. Una segunda opción es considerar C6.57 y C268e<sub>3</sub>, lo que formaría un

punto de disulfuro similar al observado en el hH<sub>1</sub>. La segunda opción tendría una menor probabilidad de existir al considerar que el residuo C6.57 está conservado en el hA<sub>2</sub>A y no participa en un punto de disulfuro. Considerando lo anterior observado se construyó un modelo del hD<sub>1</sub> con dos puntos de disulfuro (hD<sub>1</sub>\_2SS): el primero entre C3.25 y Cys186e\_2 y el segundo, tomando la primera opción, entre C268e\_3 y C277e\_3.

La construcción del modelo hD<sub>1</sub>\_2SS utilizó la metodología mencionada anteriormente (p. 18). Las gráficas relacionadas con este se encuentran en el Anexo A, p. 178.

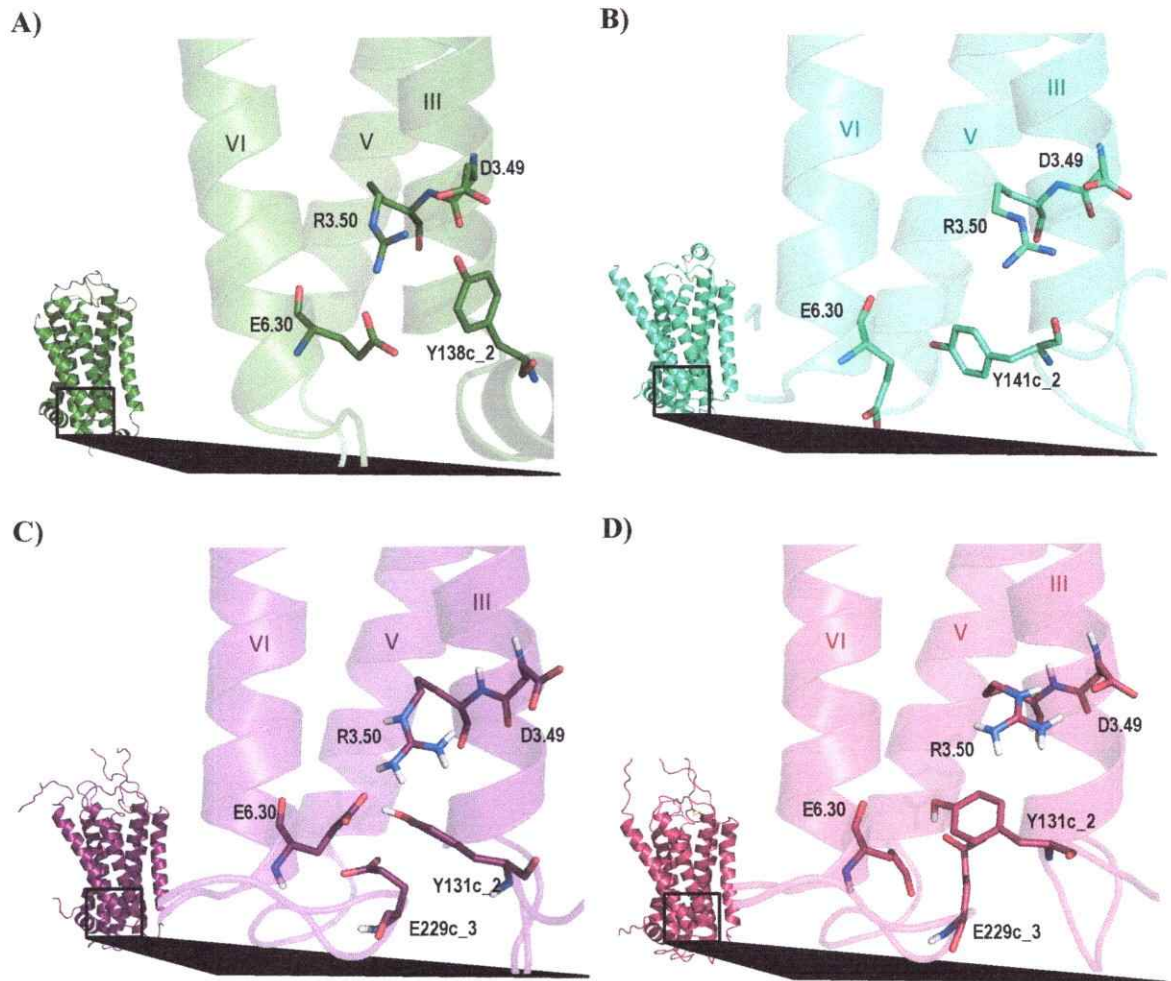
Con el fin de evaluar la estabilidad y las características de cada modelo en presencia de uno o dos puntos de disulfuro se realizó una relajación del sistema por 10 ns. Para los modelos hD<sub>1</sub>\_SS y hD<sub>1</sub>\_2SS se observó que la desviación estándar (valor de RMSD) fue en promedio 4,5 Å y 5 Å respectivamente (**Figuras 14 A**). Al evaluar el comportamiento de los dominios de transmembrana se determinó que el valor de RMSD para cada sistema (**Figuras 14 B**) fue en promedio de 2,5 Å para ambos modelos. Los resultados de simulación muestran que el sistema con doble punto de disulfuro presenta menor estabilización y mayores cambios estructurales desde la estructura inicial, aunque las diferencias no son altamente relevantes.



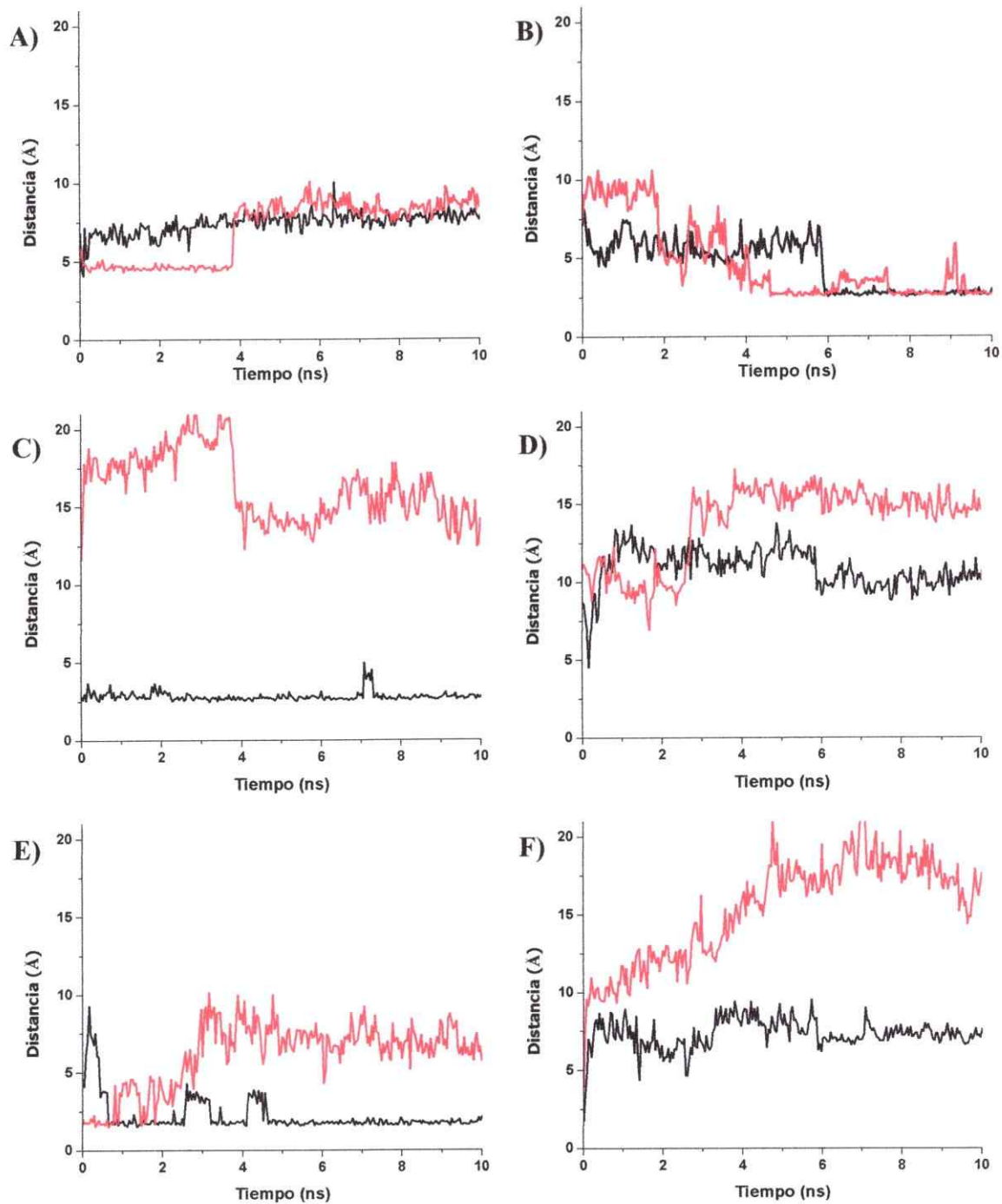
**Figura 14.** Gráficos de RMSD obtenidos de la dinámica de 10ns para hD<sub>1</sub>\_SS (—) y hD<sub>1</sub>\_2SS (—). **A)** proteína completa y **B)** dominio transmembranal.

La información entregada por las gráficas de RMSD no son decidoras para la elección de un modelo del hD<sub>1</sub> con uno o dos puentes de disulfuro. Para definir entonces el número correcto de puentes, se estudió como afecta su presencia la existencia de un cierre iónico cercano a la cara citoplasmática de los receptores observado en el estado inactivo de un 72% de los GPCR (Karnik y col., 2003; Moreira y Shi, 2010). Un estado inactivo del receptor se puede dar cuando el receptor se encuentra sin ligando (APO) o cuando se encuentra acomplejado con un antagonista, los cuales estabilizan un estado inactivo en las proteínas. El cierre iónico citoplasmático que forma parte del motivo ((D/E)R(Y/W)) se observó en las estructuras cristalinas utilizadas como molde (hD<sub>3</sub> y hβ<sub>2</sub>AR) acomplejadas con un antagonista (Rasmussen y col., 2007; Chien y col., 2010). Además en el hD<sub>3</sub> se observó que el residuo Y138c<sub>2</sub> refuerza la interacción iónica y si bien los receptores bRh y hA<sub>2</sub>A no se utilizaron como molde en ellos también se observó el cierre iónico (Palczewski y col., 2000; Jaakola y col., 2008).

De acuerdo a lo anterior los residuos que se consideraron para describir el cierre iónico en el hD<sub>1</sub> fueron: D3.49, R3.50, Y131c<sub>2</sub> y E229c<sub>2</sub> y E6.30. En el modelo hD<sub>1</sub>\_SS inicialmente los residuos adoptaron posiciones semejantes a las que tienen en el hD<sub>3</sub>, en donde todos, menos E229c<sub>2</sub>, están involucrados en la interacción. En el modelo hD<sub>1</sub>\_2SS los residuos adoptaron inicialmente una configuración semejante a la observada en la estructura del hβ<sub>2</sub>AR, donde Y131c<sub>2</sub>, E229c<sub>2</sub> y E6.30 están más bien alejados de los otros residuos. En la **Figura 15** se encuentran el estado inicial de ambos modelos y las estructuras utilizadas como molde. A continuación en la **Figura 16** se muestran las gráficas de distancia versus tiempo de los residuos potencialmente envueltos en el cierre iónico.



**Figura 15.** Visualización de la interacción iónica R3.50-E6.30 en las estructuras utilizadas como molde: **A)**  $D_3$  y **B)**  $\beta_2AR$  y en los modelos del receptor  $D_1$  con: **C)** un puente de disulfuro ( $hD_1\_SS$ ) y **D)** con dos puentes de disulfuro ( $hD_1\_2SS$ ).

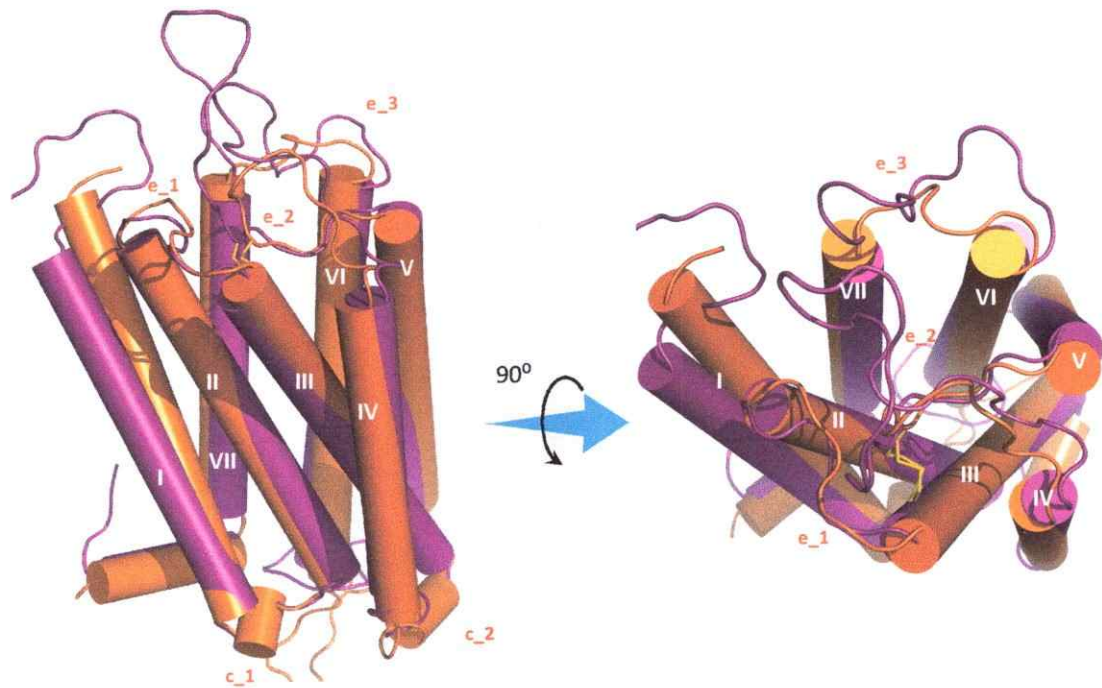


**Figura 16.** Perfiles de distancias entre residuos aminoacídicos que conformarían un cierre iónico hacia el lado intracelular del receptor en su estado inactivo para hD<sub>1</sub>\_SS (—) y hD<sub>1</sub>\_2SS (—). **A)** R3.50 - D3.49, **B)** R3.50 - E229c\_2, **C)** R3.50 - E6.30, **D)** Y131c\_2 - D3.49, **E)** Y131c\_2 - 229c\_2 y **F)** Y131c\_2 - E6.30.

Los perfiles de distancias muestran que tras 10 ns de simulación se han estabilizado las interacciones que conformarían un cierre iónico hacia el lado intracelular del receptor (**Figura 16**). Para el modelo hD<sub>1</sub>\_SS se observó que R3.50 interacciona a la vez con D3.49, E229c\_2 y E6.30 y que E229c\_2 interacciona a su vez con Y131c\_2. En hD<sub>1</sub>\_2SS se observaron menos interacciones dadas solamente entre: R3.50 con D3.49 y E229c\_2. Los perfiles de distancia manifiestan que la inclusión de un segundo puente de disulfuro, entre los residuos C268e\_3 y C277e\_3, desestabiliza la interacción iónica propuesta para un estado inactivo, dado por la ausencia de ligando. A partir de lo anterior se cree que la existencia de un segundo puente de difulfuro ubicado en el tercer lazo extracelular en el estado inactivo estudiado es poco probable.

### **Comparación estructural de hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>.**

En esta sección se describe y se comparan las características de los modelos de hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> con especial énfasis en la descripción de las características fisicoquímicas del sitio ortoestérico en ambas macromoléculas. Además se define cuáles podrían ser los puntos claves de interacción que mejoren la afinidad y/o selectividad de potenciales ligandos de RDs. En la **Figura 17** se encuentra la superposición de ambos modelos.



**Figura 17.** Superposición de los modelos de los hD<sub>1</sub> (púrpura) y hD<sub>2</sub> (anaranjado). A la izquierda vista lateral y a la derecha vista superior de los receptores. En números romanos el número de la transmembrana correspondiente.

### *Predicción de posibles sitios de interacción ligando proteína.*

Utilizando el programa ICM\_Pro se determinaron posibles sitios de interacción proteína-ligando (Anexo A, p. 179-80). Para el hD<sub>1</sub> el programa propuso 6 bolsillos: 3 de ellos hacia el espacio extracelular y 3 hacia el citosol. Debido a que la suma de los tres primeros abarca los 7 dominios transmembranales y considera todos los residuos que han sido descritos como partícipes en la interacción con ligandos, estos se consideraron para definir el bolsillo de interacción del hD<sub>1</sub> (Tomic y col., 1993; Nyrönen y col., 2001; Xhaard y col., 2006; Fu y col., 2007; Malo y col., 2010; Cueva y col., 2011; Chemel y col., 2012; Malo y col., 2012; Kołaczkowski y col., 2013; Ye y col., 2013). Lo mismo se hizo para el hD<sub>2</sub>.

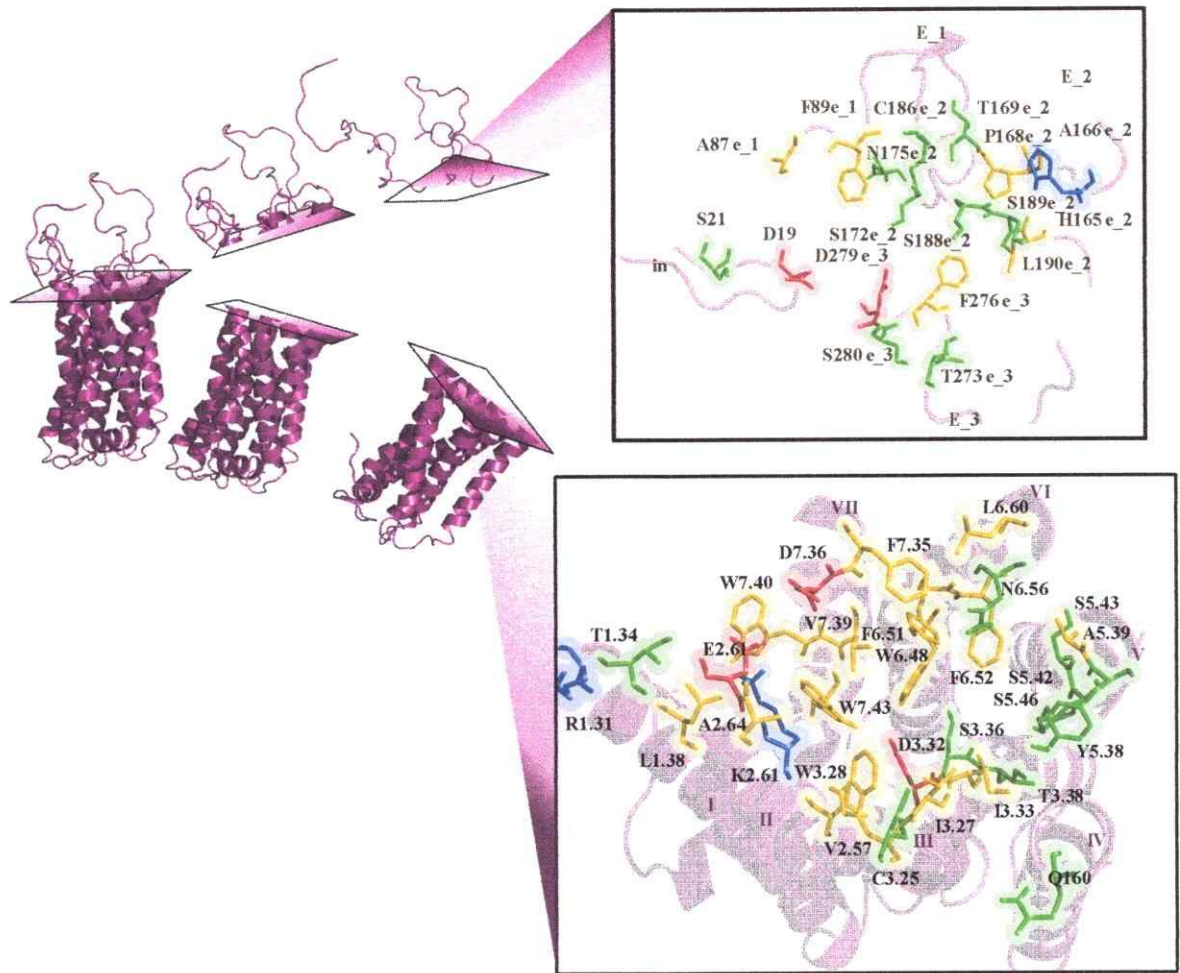
### *Sitio de interacción.*

En la **Tabla 5** se muestran los aminoácidos correspondientes al bolsillo putativo propuesto por el programa ICM\_Pro. En las **Figuras 18 y 19** se representan los mismos residuos identificándolos mediante diferentes colores según sus propiedades fisicoquímicas: rojo (residuos con carga negativa), azul (residuos con carga positiva), amarillos (residuos neutros hidrofóbicos) y verde (residuos neutros hidrofílicos).

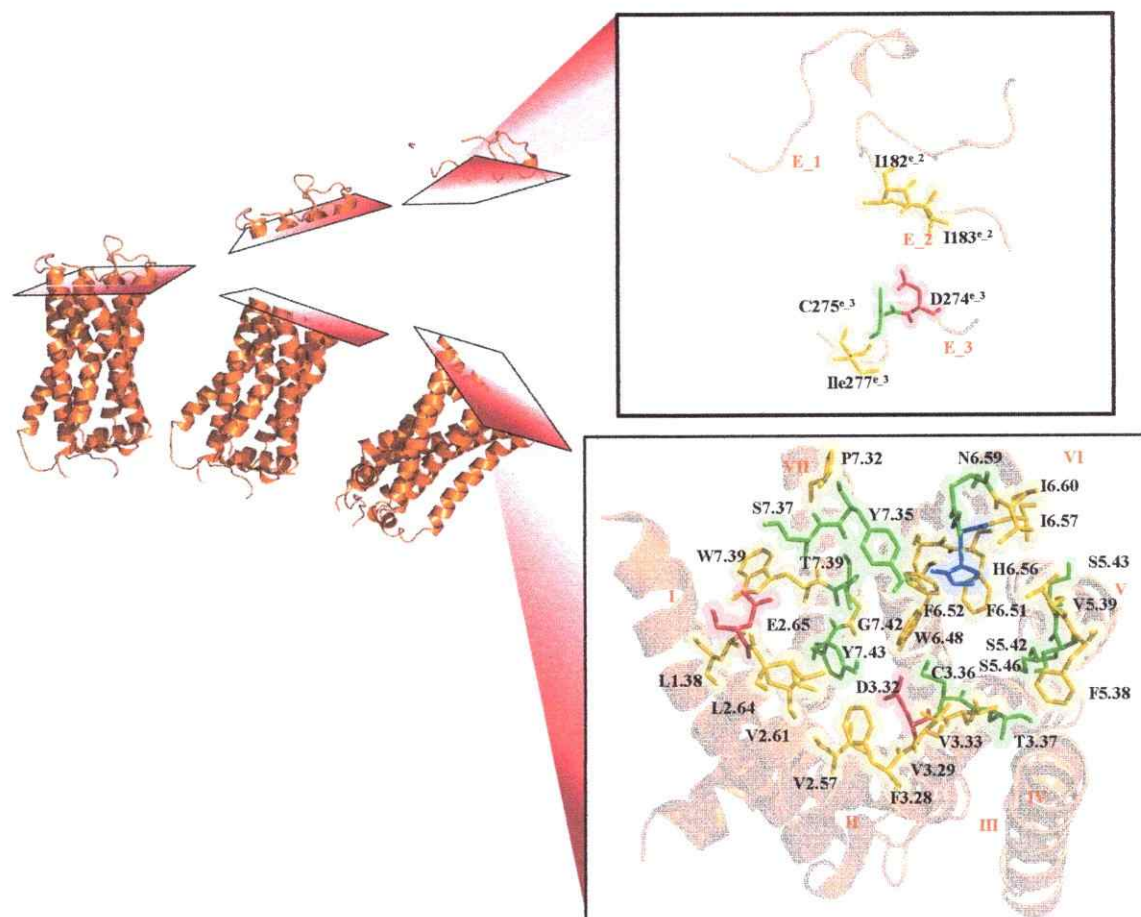


**Tabla 5.** Residuos propuestos por el programa ICM\_Pro que conformarían los bolsillos ortoestéricos de hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>.

| hD <sub>1</sub> |        | hD <sub>2</sub> |      | hD <sub>1</sub> |        | hD <sub>2</sub> |        |
|-----------------|--------|-----------------|------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| D               | 19     |                 |      | C               | 186e_2 |                 |        |
| S               | 21     |                 |      | S               | 188e_2 | I               | 183e_2 |
| R               | 1.31   |                 |      | S               | 189e_2 | I               | 184e_2 |
| T               | 1.34   |                 |      | L               | 190e_2 |                 |        |
| L               | 1.38   | L               | 1.38 | Y               | 5.38   | F               | 5.38   |
| V               | 2.57   | V               | 2.57 | A               | 5.39   | V               | 5.39   |
| K               | 2.61   | V               | 2.61 | S               | 5.42   | S               | 5.42   |
| A               | 2.64   | L               | 2.64 | S               | 5.43   | S               | 5.43   |
| E               | 2.65   | E               | 2.65 | S               | 5.46   | S               | 5.46   |
| A               | 87e_1  |                 |      |                 |        |                 |        |
| F               | 89e_1  |                 |      | W               | 6.48   | W               | 6.48   |
| G               | 93e_1  |                 |      | F               | 6.51   | F               | 6.51   |
| S               | 94e_1  |                 |      | F               | 6.52   | F               | 6.52   |
| C               | 3.25   |                 |      | N               | 6.55   | H               | 6.55   |
| I               | 3.27   |                 |      |                 |        | I               | 6.56   |
| W               | 3.28   | F               | 3.28 |                 |        | N               | 6.58   |
| V               | 3.29   | V               | 3.29 | L               | 6.59   | I               | 6.59   |
| D               | 3.32   | D               | 3.32 |                 |        | D               | 274e_3 |
| I               | 3.33   | V               | 3.33 | T               | 273e_3 | C               | 275e_3 |
| S               | 3.36   | C               | 3.36 | F               | 276e_3 | I               | 277e_3 |
| T               | 3.37   |                 |      | D               | 279e_3 |                 |        |
| Q               | 160    |                 |      | S               | 7.32   | P               | 7.32   |
| S               | 162e_2 |                 |      | F               | 7.35   | Y               | 7.35   |
| H               | 164e_2 |                 |      | D               | 7.36   |                 |        |
| A               | 166e_2 |                 |      |                 |        | S               | 7.37   |
| P               | 168e_2 |                 |      | V               | 7.39   | T               | 7.39   |
| T               | 169e_2 |                 |      | W               | 7.40   | W               | 7.40   |
| S               | 172e_2 |                 |      |                 |        | G               | 7.42   |
| N               | 185e_2 |                 |      | W               | 7.43   | Y               | 7.43   |



**Figura 18.** Residuos correspondientes al bolsillo ortoestérico propuestos por el programa ICM\_Pro para el modelo del hD<sub>1</sub>. En la parte superior derecha residuos correspondientes a los lazos extracelulares y en la parte inferior derecha residuos que conforman las TM. Los residuos se colorean de acuerdo a las siguientes propiedades: negativo/rojo; positivo/azul; hidrofóbico/amarillo; hidrofílico/verde.



**Figura 19.** Residuos correspondientes al bolsillo ortoestérico propuestos por el programa ICM\_pro para el modelo del hD<sub>2</sub> (anaranjado): en la parte superior derecha residuos correspondientes al segmento del receptor conformado por los lazos extracelulares y en la parte inferior derecha residuos que conforman las TM. Los residuos se colorean de acuerdo a las siguientes propiedades: negativo/rojo; positivo/azul; hidrofóbico/amarillo; hidrofílico/verde.

Dentro de los segmentos importantes involucrados en la interacción receptor-ligando, se ha señalado que las TM III, TM V y TM VI tendrían un rol fundamental en los GPCR de monoaminas (Karnik y col., 2003). En los modelos generados de cada receptor se observó que los residuos de los dominios mencionados anteriormente presentan una identidad aminoacídica

del 53%. Así, residuos de aminoácidos hidrofóbicos no aromáticos presentes en cada sitio sólo se diferencian en su volumen.

### *Características particulares*

En el modelo del hD<sub>2</sub>, la suma de los bolsillos extracelulares propuestos por ICM\_Pro, presentan un 56% de aminoácidos hidrofóbicos que se ubicarían principalmente en las TM III, TM VI y el lazo extracelular 3 (e<sub>3</sub>). Además en el bolsillo están presentes los residuos cargados D3.23, E2.65 e H6.55 (único cargado positivamente dentro del bolsillo) en las TM y D274e<sub>3</sub> en el lazo. El primero de ellos se encuentra en el centro del bolsillo, mientras que el segundo se ubica hacia el espacio extracelular y podría interactuar a través de un puente de hidrógeno con S7.37, lo que formaría una interacción transmembranal entre las TM I y TM VII. Por otra parte D274e<sub>3</sub> se localiza rodeado de residuos que presentan propiedades hidrofílicas. El aporte polar hidrofílico, a través de Y, S, T y C, está dado principalmente por la TM VII y el e<sub>3</sub>. En segundo lugar se encontraría la TM V, que contribuye con tres serinas: S5.42, S5.43 y S5.46 características de los complejos propuestos entre los receptores dopaminérgicos y dopamina (Tomic y col., 1993; Nyrönen y col., 2001; Seeman, 2010; Chemel y col., 2012). En último lugar la TM III aporta solo con C3.36.

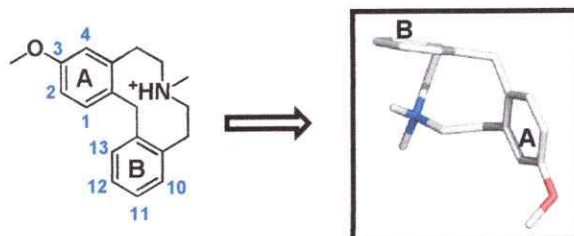
En el hD<sub>1</sub> la contribución hidrofóbica está dada por un 50% de los residuos que se encuentran ubicados principalmente, a diferencia del hD<sub>2</sub>, en las TM VI y TM VII. Además en este bolsillo existen más aminoácidos cargados que los propuestos para el hD<sub>2</sub>. De los tres residuos cargados negativamente en los segmentos de transmembrana: E2.65, D3.32 y D7.31, los dos primeros están conservados en ambos receptores. En cuanto al segmento extramembranar, el programa ICM\_Pro muestra D29 ubicado en el segmento aminoterminal y D279e<sub>3</sub>; este último podría considerarse como un residuo conservado entre ambos receptores y equivalente a D274e<sub>3</sub> en el

hD<sub>2</sub>. Los residuos transmembranales cargados positivamente son R1.31 y K2.61 y en los lazos se propuso a H164e<sub>2</sub>. Además los residuos hidrofílicos, a diferencia de hD<sub>2</sub> se ubican principalmente en la TM V y el e<sub>2</sub>.

### **Acoplamiento molecular de 3-metoxidibenz[*d,g*]acecina en los modelos del hD<sub>1</sub> y del hD<sub>2</sub>**

Una vez construidos los modelos del hD<sub>1</sub> y del hD<sub>2</sub> se realizó acoplamiento molecular (AM) utilizando el programa AutoDock4 con el antagonista 3-metoxidibenz[*d,g*]acecina (3MOD) (Tabla 6). A partir de los resultados fue posible establecer los residuos involucrados en las principales interacciones entre estos receptores y el ligando (Figura 20 y Tabla 7). Luego, para evaluar la estabilidad de los complejos formados entre 3MOD y los receptores, se realizaron simulaciones de dinámica molecular (DM). Con estos estudios se evaluaron, además de las interacciones, los cambios conformacionales de la cavidad de la proteína (Figura 23 y Tabla 8) y se propusieron modificaciones en ambos anillos aromáticos de 3MOD. Con los resultados obtenidos para los complejos receptor-ligando, con el fin de mejorar su energía de interacción y/o selectividad entre los RD, se evaluaron las modificaciones estructurales sugeridas en 3MOD en el anillo A y B (Figura 24, 41 y 42).

*"Para desarrollar una mejor descripción de los resultados los carbonos: C-1, C-2, C-3 y C-4 de 3MOD se definirán como parte del anillo aromático A y los carbonos: C-10, C-11, C-12 y C-13 como parte del anillo aromático B (Figura 20)".*



**Figura 20.** Estructura de 3MOD. **A)** Nombre de los anillos presentes en la molécula y en rojo los números correspondiente a cada átomo sustituible del anillo “B”. **B)** Visión de un modelo de 3MOD en el acoplamiento con los RD.

Los resultados del AM en ambos receptores permiten proponer la ubicación y conformación principal de 3MOD en el bolsillo descrito anteriormente (**Figura 18 y 19, Tabla 5**). Las energías predichas por el programa AutoDock4 (**Tabla 6**) indican que no existe una selectividad significativa de 3MOD por hD<sub>1</sub> ó hD<sub>2</sub>, lo que concuerda con las constantes de inhibición obtenidas experimentalmente (Mohr y col., 2006).

**Tabla 6.** Energías de acoplamiento molecular y constantes de inhibición experimentales de 3MOD en hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>.

| Receptor        | $\Delta G$ (kcal/mol) | $K_i$ (nM) <sup>1</sup> |
|-----------------|-----------------------|-------------------------|
| hD <sub>1</sub> | -7,43                 | 28,5 ± 9,7              |
| hD <sub>2</sub> | -7,91                 | 13,0 ± 9,0              |

<sup>1</sup>(Mohr y col., 2006)

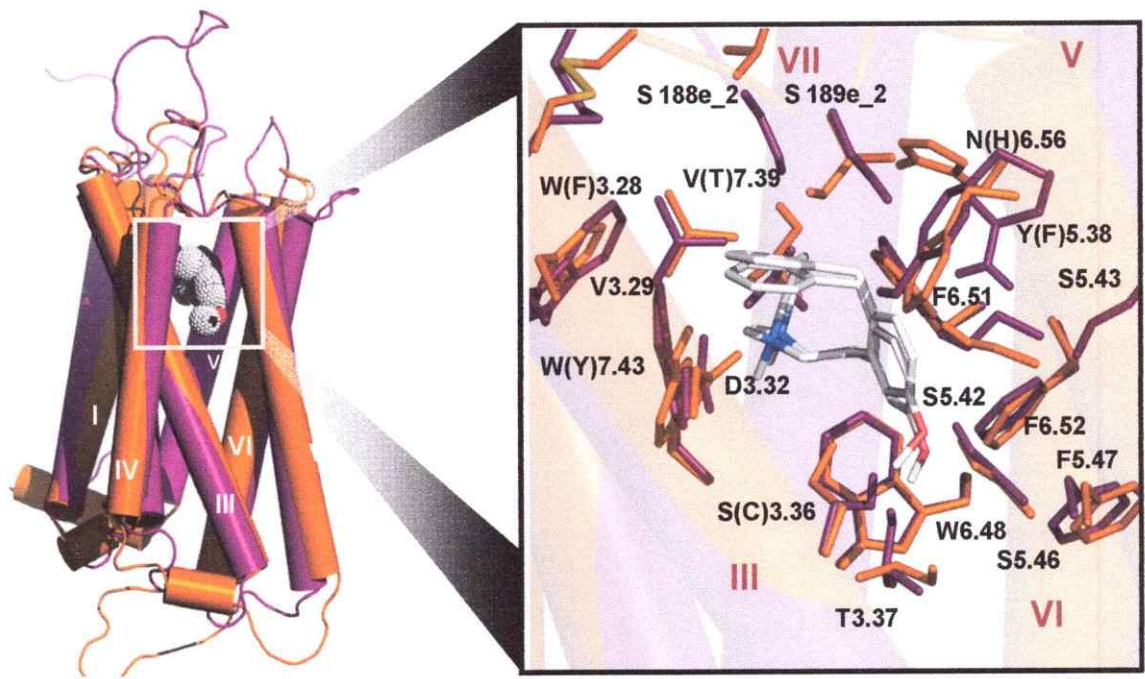
Al comparar las interacciones generadas en los complejos hD<sub>1</sub>/3MOD y hD<sub>2</sub>/3MOD se observa que:

- 3MOD genera un puente salino entre el grupo amonio y el residuo D3.32 tal como se encuentra entre receptores de dopamina y de otras monoaminas, tanto con sus ligandos endógenos como

con una amplia variedad de fármacos G (Hardman y col., 1995; Kalant y Roschlau, 1998; Ye y col., 2013).

- Con respecto al grupo metoxilo en la posición 3 del ligando, si bien se localiza hacia la TM V, el ángulo entre su oxígeno y el grupo hidroxilo de S5.46 ( $111^\circ$  en hD<sub>1</sub> y  $113^\circ$  en hD<sub>2</sub>) no es óptimo para la formación de un puente de hidrógeno (**Figura 8**) (Pauling, 1960). La importancia de la interacción con los residuos de serina de la TM V entre agonistas y el hD<sub>1</sub> ha sido confirmada mediante ensayos de mutagénesis y posterior evaluación de la afinidad y actividad con diferentes ligandos (Chemel y col., 2012). Estos estudios han informado que el intercambio de serina por alanina disminuye la afinidad y la actividad de dopamina en el hD<sub>1</sub>. La ausencia de esta interacción en los presentes resultados de AM podría corresponder a la actividad antagonista informada para esta molécula en los RDs (Enzensperger y col., 2007).
- Por otro lado la posición de ambos grupos aromáticos de la estructura de 3MOD (anillos A y B, **Figura 6**) estaría estabilizada por un bolsillo hidrofóbico que ha sido descrito en la estructura cristalina del complejo formado entre el hD<sub>3</sub> y eticloprida (Chien y col., 2010). De los aminoácidos que rodean al anillo A, se ha propuesto que los residuos aromáticos W6.48 y F6.51 contribuyen de manera importante a la estabilización de la noradrenalina en el receptor  $\beta_2$ AR, receptor que presenta una alta identidad aminoacídica con los receptores de dopamina (comentado anteriormente en la p. 38) (Taddese y col., 2013). También se ha postulados que el residuo W6.48 desempeña un rol importante en el mecanismo de activación y de desactivación en los receptores de monoaminas (Nyrönen y col., 2001; Selent y col., 2010).

Las interacciones generales anteriormente descritas están de acuerdo con las características de la cavidad propuesta para monoaminas endógenas y otros fármacos activos en este tipo de receptor.



**Figura 21.** A la izquierda se muestra la superposición de los receptores hD<sub>1</sub> (púrpura) y hD<sub>2</sub> (anaranjado). Además se muestra el ligando (blanco) como superficie punteada en la conformación mayoritaria obtenida por AM. A la derecha se encuentra una ampliación de la zona de interacción entre las macromoléculas y el ligando. Entre paréntesis residuos del hD<sub>2</sub>.



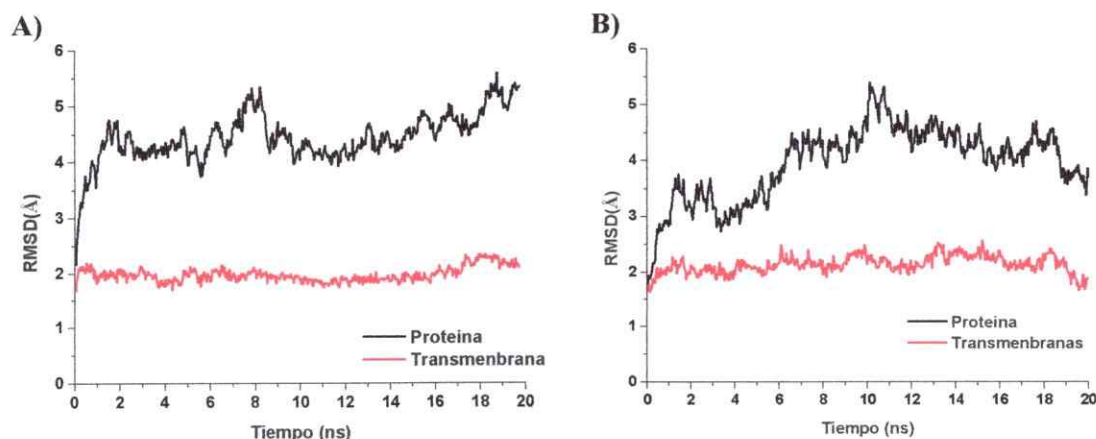
**Tabla 7.** Residuos en las cavidades de unión de los complejos hD<sub>1</sub>/3MOD y hD<sub>2</sub>/3MOD.

| hD <sub>1</sub> |        | hD <sub>2</sub> |         |
|-----------------|--------|-----------------|---------|
| V               | 2.57   | V               | 2.57    |
| W               | 3.28   | F               | 3.28    |
| V               | 3.29   | V               | 3.29    |
| D               | 3.32   | D               | 3.32    |
| I               | 3.33   | V               | 3.33    |
| S               | 3.36   | C               | 3.36    |
| T               | 3.37   | T               | 3.37    |
| I               | 4.52   | I               | 4.52    |
|                 |        | L               | 4.57    |
| S               | 188e_2 | I               | 183e_2  |
| S               | 189e_2 | I               | 184 e_2 |
| Y               | 5.38   | F               | 5.38    |
| S               | 5.42   | S               | 5.42    |
| S               | 5.43   | S               | 5.43    |
| S               | 5.46   | S               | 5.46    |
| F               | 5.47   | F               | 5.47    |
| W               | 6.48   | W               | 6.48    |
| F               | 6.51   | F               | 6.51    |
| F               | 6.52   | F               | 6.52    |
| N               | 6.55   | H               | 6.55    |
| F               | 7.35   | Y               | 7.35    |
| V               | 7.39   | T               | 7.39    |
|                 |        | G               | 7.42    |
| W               | 7.43   | Y               | 7.43    |

### Dinámica Molecular (DM)

Los resultados de DM obtenidos para los complejos insertos en una bicapa lipídica dan cuenta de la estabilidad del sistema en un determinado intervalo de tiempo (20 ns). Para los complejos hD<sub>1</sub>/3MOD y hD<sub>2</sub>/3MOD se observó que la desviación estándar (valor RMSD) fue en promedio de 5 Å cuando se consideró el receptor completo (Figuras 22 A y B, línea continua —). Sin embargo, se observó que existen fluctuaciones que impiden que el sistema se mantenga estable durante la dinámica. Dichas fluctuaciones tienen origen en algunos casos en interacciones entre los iones sodio del medio y los aminoácidos cargados negativamente de los lazos.

Buscando evaluar el comportamiento del dominio transmembranal se determinó el valor de RMSD para cada sistema (Figuras 22 A y B, línea continua 10, —), encontrándose que esta desviación fue en promedio de 2 Å, la cual logra estabilizarse rápidamente. Uno de los movimientos más pronunciados se produjo al inicio de la TM V en hD<sub>1</sub>, donde el C $\alpha$  de R5.36 (residuo ubicado en la parte superior de la TM V) se mueve 6,6 Å de su posición inicial hacia el interior del bolsillo (Anexo A, p. 181).

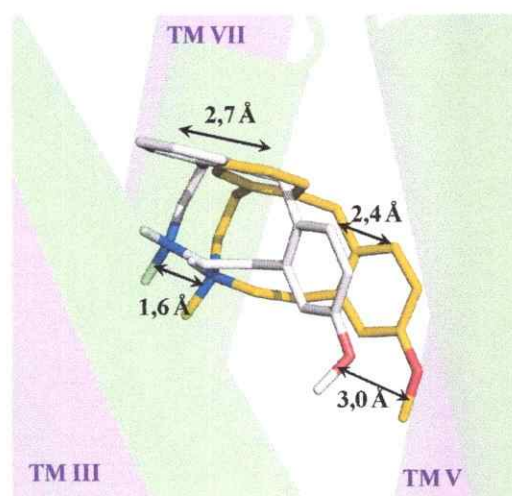


**Figura 22.** Gráfico de RMSD obtenido de la dinámica de 20ns para la proteína completa (—) y para los 7 dominios de transmembrana (—): **A)** hD<sub>1</sub>/3MOD y **B)** hD<sub>2</sub>/3MOD

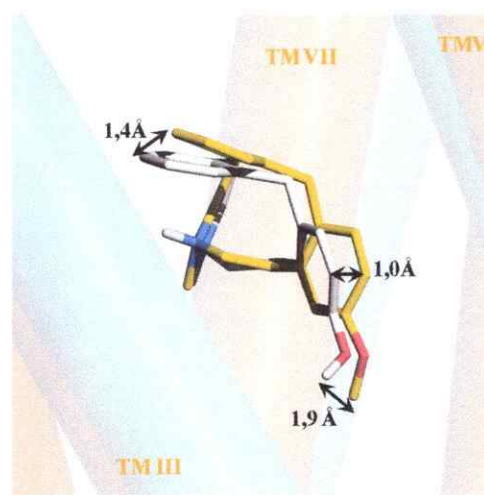
Respecto al ligando es posible observar en la **Figura 23** que no existen mayores diferencias al finalizar la simulación respecto al lugar donde estaría interactuando en el receptor. En el caso del complejo con hD<sub>1</sub> el ligando se mueve 1,6 Å, pero esto no tiene mayor influencia en las interacciones a nivel global entre el ligando y los aminoácidos de la cavidad. Es probable que el movimiento descrito anteriormente, en la parte superior de la TM V, tenga implicancias en el cambio observado en el complejo hD<sub>1</sub>/3MOD. Por ello, un mayor número de residuos del extremo fijo del lazo extracelular 2 (e<sub>2F</sub>) de la TM V participan ahora en la interacción. Por otra parte, en el complejo con hD<sub>2</sub> no se observa desplazamiento.

En la **Tabla 8** se encuentran los residuos más cercanos al ligando para ambos complejos a 0 y 20 ns.

**A) hD<sub>1</sub>**



**B) hD<sub>2</sub>**



**Figura 23.** Movimiento de 3MOD en el bolsillo después de 20 ns de DM. Ligando a 0 ns blanco y a 20 ns amarillo. **A)** Complejo hD<sub>1</sub>. A 0 ns: proteína púrpura y a 20 ns: proteína verde, **B)** Complejo hD<sub>2</sub>. A 0 ns: proteína anaranjada y a 20 ns proteína celeste.

**Tabla 8.** Residuos a 5 Å del ligando 3MOD en el hD<sub>1</sub> y en el hD<sub>2</sub> a 0 ns y 20 ns.

| hD <sub>1</sub>     |                                  | hD <sub>2</sub>      |                      |
|---------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| 0 ns                | 20 ns                            | 0 ns                 | 20 ns                |
| V 2.57              |                                  | V 2.57               | V 2.57               |
| W 3.28              |                                  | F 3.28               | F 3.28 <sup>a</sup>  |
| V 3.29              | V 3.29                           | V 3.29               | V 3.29               |
| D 3.32              | D 3.32                           | D 3.32               | D 3.32               |
| I 3.33              | I 3.33                           | V 3.33               | V 3.33               |
| S 3.36              | S 3.36                           | C 3.36               | C 3.36               |
| T 3.37              | T 3.37                           | T 3.37               | T 3.37               |
|                     | I 3.40                           |                      | I 3.40               |
| I 4.52              |                                  | I 4.52               |                      |
|                     |                                  | L 4.57               | L 4.57               |
|                     |                                  |                      | C 182 e <sub>2</sub> |
| S 188e <sub>2</sub> |                                  | I 183e <sub>2</sub>  | I 183e <sub>2</sub>  |
| S 189e <sub>2</sub> | S 189e <sub>2</sub>              | I 184 e <sub>2</sub> | I 184 e <sub>2</sub> |
|                     | L 190e <sub>2</sub> <sup>a</sup> |                      |                      |
|                     | S 191e <sub>2</sub>              |                      |                      |
|                     | R 5.36 <sup>a</sup>              |                      |                      |
| Y 5.38              | Y 5.38                           | F 5.38               | F 5.38               |
|                     | A 5.39                           |                      | V 5.39               |
| S 5.42              | S 5.42                           | S 5.42               | S 5.42               |
| S 5.43              | S 5.43                           | S 5.43               |                      |
| S 5.46              | S 5.46                           | S 5.46               | S 5.46               |
| F 5.47              | F 5.47 <sup>b</sup>              | F 5.47 <sup>b</sup>  | F 5.47 <sup>b</sup>  |
|                     | F 6.44                           |                      | F 6.44               |
| W 6.48              | W 6.48                           | W 6.48               | W 6.48               |
| F 6.51              | F 6.51                           | F 6.51               | F 6.51               |
| F 6.52              | F 6.52                           | F 6.52               | F 6.52               |
| N 6.55              |                                  | H 6.55               | H 6.55               |
| F 7.35              | F 7.35                           | Y 7.35               | Y 7.35               |
| V 7.39              | V 7.39                           | T 7.39               | T 7.39               |
|                     |                                  | G 7.42               | G 7.42               |
| W 7.43              |                                  | Y 7.43               | Y 7.43               |

<sup>a</sup> La cadena lateral no apunta hacia el ligando; <sup>b</sup> Cadena lateral relacionada con bolsillo aromático.

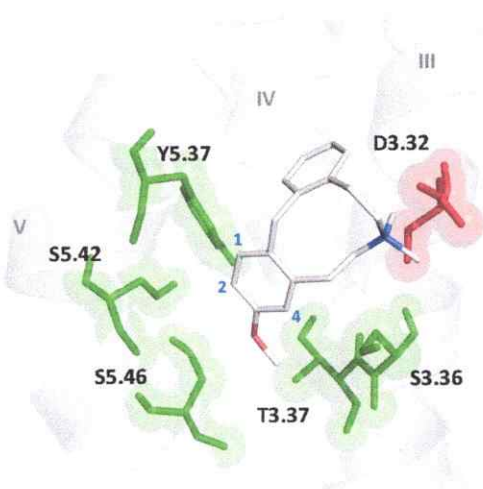
En ambos complejos permanece la interacción entre el grupo amonio del ligando y D3.32. Además las cadenas laterales de los residuos de serina de la TM V (S5.42, S5.43 y S5.46) que han sido propuestas como el punto de interacción del grupo catecol de DA en los RD, se ubican hacia afuera del bolsillo, haciendo menos probable la interacción con el grupo metoxilo de 3MOD, lo que corrobora su carácter de antagonista predicho también por AM.

Considerando los antecedentes bibliográficos (Wu y col., 2005; Zhang y col., 2008; Zhang y col., 2009; Qiang y col., 2010) y los resultados descritos anteriormente (**Tabla 8**), se estudiaron las potenciales modificaciones de los anillos A y B de 3MOD y la factibilidad sintética con el fin de mejorar su interacción con los RD hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>.

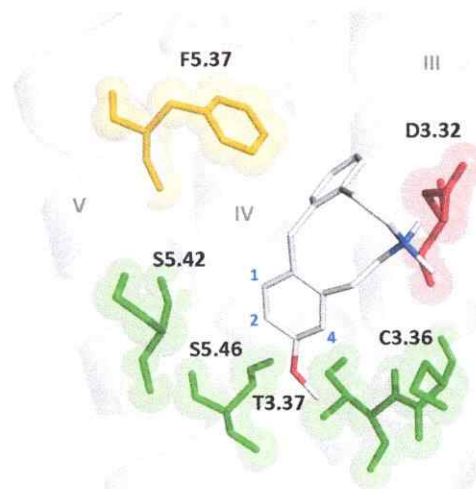
#### **Potenciales modificaciones del anillo A de 3MOD**

Anteriormente se estableció que el anillo A de 3MOD estaría estabilizado en los complejos con hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>, por medio de interacciones hidrofóbicas aportadas por los grupos aromáticos presentes en la TM VI. Por otro lado, los residuos que se direccionan hacia los carbonos modificables del anillo A son en su mayoría de tipo polar (S, T y C) y en menor número residuos apolares (Y o F). En la **Figura 24** se muestran los residuos que se direccionan hacia los carbonos del anillo A.

A)



B)



**Figura 24.** Residuos que se direccionan hacia los carbonos del anillo A en el complejo formado entre: **A)** hD<sub>1</sub>/3MOD y **B)** hD<sub>2</sub>/3MOD. Ellos se colorean de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas como: hidrofílico/verde, hidrofóbico/amarillo, cargado positivamente/azul y cargado negativamente/rojo.

La evaluación de las posibilidades de modificación del C-1 tomó en cuenta la flexibilidad del segmento superior de la TM V observada en la simulación. De acuerdo a lo anterior se observó que el C-1 se encuentra cercano a Y(F)5.38, S5.42 y S5.43. Por esta razón modificaciones que incluyan grupos capaces de generar interacciones  $\pi$  con Y(F)5.38 (grupos como bencilo y nitrilo) o que formen puente de hidrógeno o de halógeno con S5.42 y S5.43 (grupos como OH, NH<sub>2</sub>, Cl, Br) potenciarían la interacción con ambos receptores. Tanto el C-2 y como el C-4 se encuentran rodeados por residuos hidrofílicos (S(C)3.36, T3.37, S5.42, S5.43 y S5.46) por lo cual las modificaciones propuestas para el C-1 en relación a los residuos hidrofílicos también valen para estas posiciones.

Como se señaló antes, es necesario considerar la factibilidad sintética de obtención de los derivados mencionados. Para ello, considerando que solamente se conocen derivados de 3MOD

con sustituyentes en el anillo A, se evalúan los derivados existentes de su análogo LE-404 o similares (**Tabla 9**).

*Factibilidad sintética de modificaciones sobre los átomos de carbono:*

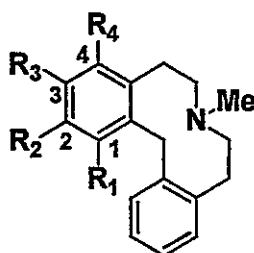
*C-1:* Existen 4 derivados de dibenz[*d,g*]acecina con sustituyentes en el C-1. De ellos no hay combinación que incluya una sustitución en el C-3 con -OH o -MeO. De los derivados que presentan en el C-1 un grupo -OH (**4b**) o un grupo -MeO (**4c**) se observa con respecto a sus homólogos en el C-3 una disminución y un aumento de la afinidad respectivamente (**Figura 25, Tabla 9**). Otro derivado, es el que presenta en el C-1 un cloro y en el C-2 un -OH observándose un incremento de la afinidad en 20 veces con respecto al compuesto no clorado (**Figura 25, Tabla 9**, compuestos **4d** y **4e** respectivamente).

Los derivados conocidos con sustitución en el C-1 entregan antecedentes que indican que esta posición se encontraría rodeada más bien por un bolsillo hidrofóbico, que de acuerdo a nuestros resultados podría estar conformado por Y(F)5.38 y por A(V)5.39. El aumento de la afinidad observado con el halógeno y su capacidad de formar un " $\sigma$ -hole" podrían indicar una potencial interacción específica de tipo puente de halógeno con la nube aromática del residuo Y(F)5.38.

*C-2:* Existen 7 derivados de dibenz[*d,g*]acecina con sustituyentes en el C-2. De ellos están los derivados de LE-404 que incluyen en C-2 un grupo -NH<sub>2</sub> y un grupo -Cl (**Figura 25, Tabla 9**, compuesto **4f** y **4g** respectivamente). En ninguno de los dos casos se observó una mejor afinidad. Posiblemente en C-2 se requiera un mejor aceptor de puente de hidrógeno que el -NH<sub>2</sub> para potenciar la afinidad.

*C-4:* Al igual que con los derivados en las posiciones anteriores no hay una gran diversidad de compuestos sintetizados. Entre ellos se destaca un derivado de LE-404 clorado en el C-4 (**4h**), sustitución que aumentó la afinidad por el hD<sub>2</sub> (**Tabla 9**). Sustituciones con halógenos en una

posición análoga a C-4 en derivados de dibenzacepinas (ver introducción, **Tabla 1**) han mostrado que la presencia del halógeno influye en la afinidad. Este incremento posiblemente no se deba solamente a un aporte de tipo lipofílico, ya que el derivado metilado no muestra un incremento de la afinidad con respecto al no sustituido.



**Figura 25.** Estructura de la dibenz[*d,g*]acecina y posiciones de sustitución conocidas detalladas en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Derivados de dibenz[*d,g*]acecinas con constante de afinidad conocidas.

| Nombre     | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | hD <sub>1</sub>                  | hD <sub>2</sub> |
|------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------------------------|-----------------|
|            |                |                 |                |                | K <sub>i</sub> (nM) <sup>1</sup> |                 |
| 3a, 3MOD   | H              | H               | OMe            | H              | 28,5                             | 13,0            |
| 4a, LE-404 | H              | H               | OH             | H              | 0,39                             | 17,5            |
| 4b         | OH             | H               | H              | H              | 8,7                              | 84              |
| 4c         | OMe            | H               | H              | H              | 7,6                              | 164             |
| 4d         | H              | OH              | H              | H              | 8,9                              | 36,9            |
| 4e         | Cl             | OH              | H              | H              | 0,46                             | 0,99            |
| 4f         | H              | NH <sub>2</sub> | OH             | H              | 9,3                              | 37,3            |
| 4g         | H              | Cl              | OH             | Cl             | 3,2                              | 88              |
| 4h         | H              | H               | OH             | Cl             | 0,83                             | 24,6            |

<sup>1</sup>(Mohr y col., 2006)

De acuerdo a lo anterior, no han sido sintetizados derivados de dibenz[*d,g*]acecina con sustituyentes en C-1/C-3, lo que hace pensar una dificultad sintética para obtener moléculas de este tipo. En el caso de los derivados con sustituciones en C-2/C-3, ya se han descrito derivados con grupos capaces de establecer puentes de hidrógeno o de halógeno y estos no mejoran la



afinidad. Respecto a la derivatización en C-4/C-3 con halógenos se sabe que el derivado clorado de LE-404 se obtiene modificando este mismo en un solo paso sintético y ya se mencionó la similitud del segmento que incluye al C-4 con el de las benzacepinas halogenadas. De acuerdo a los antecedentes mostrados anteriormente se propone que la mejor opción de modificación del anillo A de 3MOD sería incluyendo halógenos en el C-4.

### **Evaluación por simulación molecular de las propuestas de modificación del anillo A de 3MOD**

Para evaluar la derivatización de 3MOD con halógenos en el C-4 por medio de AM se debe considerar que no hay muchos estudios empleando estas técnicas sobre la interacción entre halógenos y proteínas. Para ello se propone utilizar a modo de estandarización la boldina y sus derivados halogenados, que se cree que interaccionarían y aumentarían su afinidad por el hD<sub>1</sub> por medio de puentes de halógeno (ver Introducción p. 12).

*"La hipótesis de utilizar boldina y sus derivados halogenados para el desarrollo del estudio de la interacción por puente de halógeno fue basada en las constantes de afinidad obtenidas el año 2006. En esa oportunidad se utilizó tejido homogeneizado de cuerpo estriado de rata para obtener las constantes de afinidad, las cuales reflejaban una marcada tendencia que mejoraba la afinidad al incrementar el tamaño del halógeno, lo que sugería la presencia de un puente de halógeno. En el transcurso del desarrollo de la tesis (año 2015) las constantes de inhibición para la boldina y sus derivados 3-halogenados fueron actualizadas (Tabla 10). La metodología utilizada en su obtención utilizó el D<sub>1</sub> humano expresado en células CHO-K1, metodología que no presenta artefactos a diferencia del homogeneizado de cuerpo estriado de rata. Las constantes obtenidas, en esta segunda oportunidad, mostraron diferencias siendo el caso de la*

*3-yodoboldina el más extremo de las nuevas constantes conocidas, pasando desde una constante 147 veces mayor que la de la boldina en cuerpo estriado de rata a una tan sólo 8 veces mayor en el receptor humano expresado en células heterólogas.*

**Tabla 10.** *Constantes de inhibición de la boldina y sus derivados halogenados en los receptores "D<sub>1</sub>-like" de homogeneizado de cuerpo estriado cerebral de rata (2006) y del D<sub>1</sub> humano expresado en células CHO-K1 (2015).*

| 3-Xboldina | <i>D<sub>1</sub>K<sub>i</sub> (nM)</i> |       |
|------------|--|-------|
|            | 2006 <sup>1</sup>                      | 2015  |
| <i>H</i>   | 294                                    | 189,9 |
| <i>Me</i>  | ---                                    | 46,9  |
| <i>Cl</i>  | 60                                     | 38,6  |
| <i>Br</i>  | 49                                     | 25,0  |
| <i>I</i>   | 2                                      | 23,4  |
| <i>F</i>   | --                                     | --    |

<sup>1</sup>(Sobarzo-Sánchez y col., 2000; Asencio y col., 2005)

*Las nuevas constantes de afinidad de la boldina y sus derivados no descartan la posible presencia del puente de halógeno, pero tampoco la confirman dada la poca diferencia entre los valores para 3-metil- y 3-cloroboldina. Al respecto, hay que notar que una comparación de las IC<sub>50</sub> de los inhibidores de catepsina L con metilo y cloro (ver introducción p. 11) arroja un aumento de la afinidad de solo 6 veces.*

*De acuerdo a lo anterior, la investigación realizada de la interacción de puentes de halógeno por medio de simulación molecular se correlacionará con las nuevas constantes".*

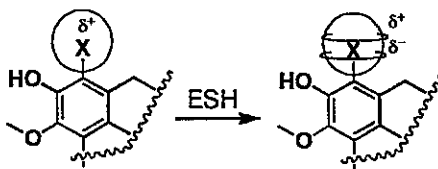
#### *Evaluación de la interacción de puente de halógeno*

En esta sección con el fin de evaluar por medio de AM la probabilidad de la presencia de puente de halógeno entre complejos formados por el hD<sub>1</sub> y moléculas de afinidad conocida, se utilizaron dos programas de acoplamiento: Autodock 4.2 y Dock 6.0. Además, para evaluar la

estabilidad del sistema, se realizó una simulación por dinámica molecular.

#### *Acoplamiento molecular utilizando Dock6.0*

Dock6.0 es un programa del cual se ha informado que es capaz de reconocer la presencia de un puente de halógeno. La metodología utilizada toma complejos cristalinos con ligandos halogenados y al ligando se le aplica un “script” que modifica las cargas del halógeno, para posteriormente realizar el AM (Kolar y col., 2013). El “script” hace explícita la distribución electrónica anisotrópica del halógeno, lo que se traduce en la representación de un “sigma-hole” (ESH = explicit  $\sigma$ -holes, **Figura 26**) capaz de ser reconocido por el programa Dock6.0.



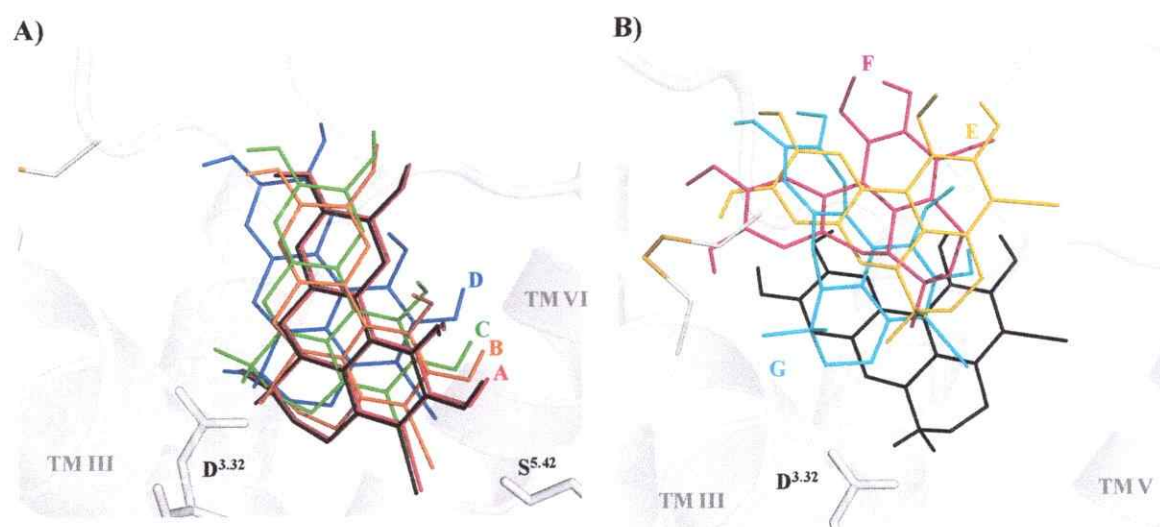
**Figura 26.** Representación de la aplicación del “script” sobre el ligando.

Para evaluar la diferencia que genera la aplicación del “script” en las cargas de las moléculas halogenadas (Cl, Br y I) se realizó el AM del derivado 3-yodoboldina en presencia y ausencia de ESH.

El resultado muestra que el ligando adopta un mayor número de posiciones en la cavidad definida para el acoplamiento que las observadas por medio del programa AutoDock 4 (ver más adelante p. 74). De estas posiciones solamente fueron consideradas para el análisis del efecto las que presentan energías de van der Waals ( $E_{vdW}$ ) negativas y aquellas donde el grupo amonio de su estructura se encuentra dirigido hacia D3.32. Con o sin la aplicación de ESH las posiciones que adopta la 3-yodoboldina son similares (**Figura 27, Tabla 11**). Además se observó que a

medida que aumenta la energía de acoplamiento, dada principalmente por el cambio en la  $E_{vdW}$ , existe un desplazamiento del ligando. En las posiciones de menor energía el metoxilo en el C-1 y el hidroxilo en el C-2 de la 3-yodoboldina se dirigen hacia la TM V (**Figura 27 A**). En cambio, en las posiciones de mayor energía estos grupos se encuentran dirigidos hacia el espacio extracelular (**Figura 27 B**).

Las energías de acoplamiento entregadas por el programa ( $E_{grid}$ ) están compuestas por la sumatoria de dos términos energéticos: energía electrostática ( $E_{elect}$ ) y  $E_{vdW}$ . Cuando se aplica el ESH, si bien  $E_{grid}$  es menor, el porcentaje de  $E_{vdW}$  en ella es un 5% mayor (**Tabla 11**).



**Figura 27.** Posiciones obtenidas a partir del AM de 3-yodoboldina con  $hD_1$ . **A)** Posiciones de menor energía y **B)** posiciones de mayor energía. En negro la posición del ligando obtenida por el programa Autodock. Las posiciones obtenidas por Dock 6.0 se identifican con una letra mayúscula de color y su valor energético se encuentra descrito en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.**  $E_{grid}$  y  $E_{vdw}$  para las posiciones que toma la 3-yodoboldina en el  $hD_1$ .

| Posición | sin ESH               |                                  | con ESH               |                                  |
|----------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
|          | $E_{grid}$ (kcal/mol) | $E_{vdw} / (\%)^a$<br>(kcal/mol) | $E_{grid}$ (kcal/mol) | $E_{vdw} / (\%)^a$<br>(kcal/mol) |
| A        | -83,68                | -42,58/(51)                      | -75,63                | -41,65/(55)                      |
| B        | -83,58                | -41,90/(50)                      | -75,61                | -41,83/(55)                      |
| C        | -68,47                | -27,44/(40)                      |                       |                                  |
| D        | -63,76                | -25,71/(40)                      |                       |                                  |
| E        | -54,37                | -24,23/(45)                      |                       |                                  |
| F        |                       |                                  | -68,99                | -36,63/(53)                      |
| G        | -51,12                | -17,03/(33)                      | -52,46                | -26,16/(50)                      |

<sup>a</sup> Porcentaje de aporte energético a  $E_{grid}$ .

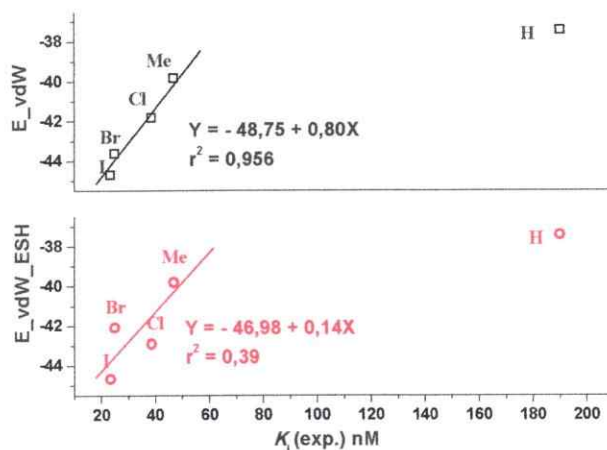
Considerando que los resultados anteriores no son concluyentes se realizó el AM para la boldina y los otros derivados (F-, Cl-, Br- y Me-boldina) con o sin ESH en los casos en que es posible la presencia del puente de halógeno (Cl y Br). Al igual que en el caso de la 3-yodoboldina las posiciones que adoptan los otros derivados son múltiples, pero se asemejan a las observadas para el derivado yodado. En cuanto al aporte de  $E_{vdw}$  a  $E_{grid}$ , este disminuye al disminuir el tamaño del halógeno. En la **Tabla 12** se encuentra la  $E_{vdw}$  de la posición de menor energía total (posición "A") de los derivados de boldina con y sin ESH.

**Tabla 12.**  $E_{vdw}$  para la posición A en el  $hD_1$  de la boldina y sus derivados.

| 3-Xboldina | $E_{vdw}$ (kcal/mol) / (%) <sup>a</sup> |             |
|------------|---|-------------|
|            | sin ESH                                 | con ESH     |
| H          | -37,43/(46)                             | -37,43/(46) |
| Me         | -39,81/(48)                             | -39,81/(48) |
| Cl         | -41,80/(50)                             | -42,90/(54) |
| Br         | -43,62/(51)                             | -42,09/(54) |
| I          | -44,68/(52)                             | -44,66/(58) |
| F          | -37,83/(47)                             | -37,83/(47) |

<sup>a</sup> Porcentaje de aporte energético a  $E_{grid}$ .

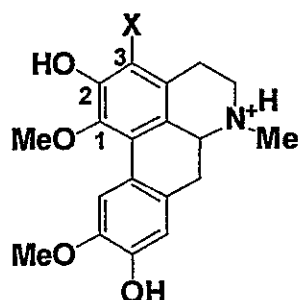
Una vez obtenidas las  $E_{vdw}$  (Tabla 12) se construyeron los gráficos de estas en ausencia y presencia de ESH (Figura 28) versus las constantes de inhibición experimentales actualizadas (Tabla 10). En ninguno de los casos se obtuvo una tendencia lineal. Al separar las boldinas sustituidas de la boldina sin sustitución en el C-3 se obtiene una tendencia que correlaciona linealmente en el caso de la ausencia de ESH ( $r^2=0,96$ ). En presencia de ESH la correlación empeora ( $r^2=0,39$ ).



**Figura 28.** Gráficos de  $E_{vdw}$  calculadas sin ESH (—, □) y con ESH (—, ○) versus las constantes de inhibición experimentales actualizadas (Tabla 10).

Los resultados anteriores no pueden descartar el Programa Dock6 como lector de la interacción por puente de halógeno, porque es posible que no se hayan utilizado los parámetros más apropiados para la lectura del ESH debido a que no son informados en la referencia. De acuerdo a lo anterior, los resultados pueden considerarse como preliminares en la búsqueda de los parámetros adecuados.

Los resultados de AM con el programa *AutoDock 4.2* posicionan la boldina (**Figura 29**) de dos formas alternativas dentro de la cavidad (**Figura 30**) definida para el receptor (p. 51). En la **Tabla 13** se encuentran los aminoácidos que rodean las dos posiciones.



**Figura 29.** Estructura de la boldina y numeración de las posiciones de sus átomos. “X” representa el átomo de hidrógeno, de halógeno, o un grupo metilo según el caso.

**Tabla 13.** Residuos alrededor de las dos posiciones de la boldina en el hD<sub>1</sub>.

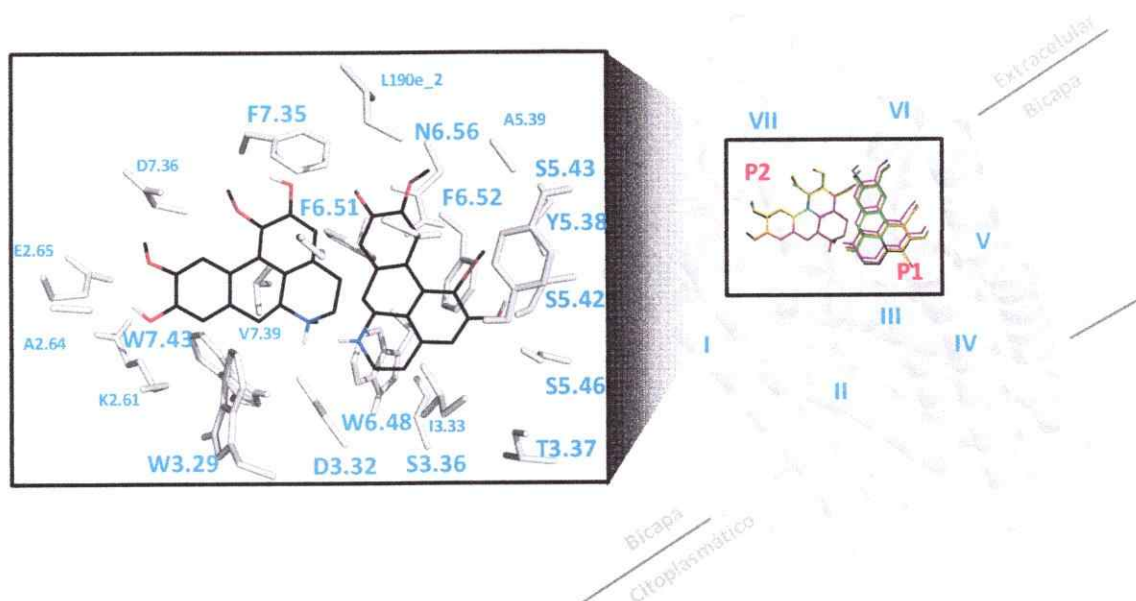
| Comunes  | Posición 1 | Posición 2 |
|----------|------------|------------|
| D 3.32   | S 3.36     | K 2.61     |
| S 188e_2 | T 3.37     | A 2.64     |
| S 189e_2 | L 190e_2   | E 2.65     |
| W 6.48   | Y 5.38     | W 3.29     |
| F 6.51   | A 5.39     | D 7.36     |
| N 6.55   | S 5.42     | W 7.43     |
| F 7.35   | S 5.43     |            |
| V 7.39   | S 5.46     |            |
|          | F 6.52     |            |

Cada una de las posiciones que adopta la boldina (**Figura 30**) en la cavidad presentó igual probabilidad de ocurrencia y una energía de “docking” similar (**Tabla 14**). En el AM de los derivados 3-Xboldina también se posicionaron en ambas orientaciones, aumentando la probabilidad de ocurrencia de la posición 1 en el caso de la 3-metilboldina congruente con la disminución de la energía en esta orientación. El derivado fluorado también ocupa las dos posiciones con igual probabilidad aunque sus energías difieren entre sí. El derivado clorado muestra una notable disminución de su energía en la posición 1 asociado a una considerablemente mayor probabilidad de ocurrencia comparada con la posición 2, que conlleva una disminución moderada de la energía. Los derivados bromado y yodado muestran probabilidades progresivamente mayores de ocupar la posición 2 que van asociadas con menores energías desde esta posición, aunque en la posición 1 también disminuyen sus energías con respecto a la boldina.

**Tabla 14.** Resultados del acoplamiento molecular de 3-Xboldinas.

| 3-Xboldina      | Posición 1                                 |                               | Posición 2                                 |                               |
|-----------------|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
|                 | $\Delta G_{\text{estimada}}$<br>(kcal/mol) | Probabilidad<br>de ocurrencia | $\Delta G_{\text{estimada}}$<br>(kcal/mol) | Probabilidad<br>de ocurrencia |
| H               | -5,53                                      | 44                            | -5,14                                      | 44                            |
| F               | -5,39                                      | 44                            | -4,89                                      | 46                            |
| Cl              | -6,44                                      | 81                            | -5,65                                      | 19                            |
| Br              | -6,29                                      | 33                            | -5,87                                      | 67                            |
| I               | -6,18                                      | 21                            | -6,03                                      | 79                            |
| CH <sub>3</sub> | -6,14                                      | 64                            | -5,52                                      | 36                            |





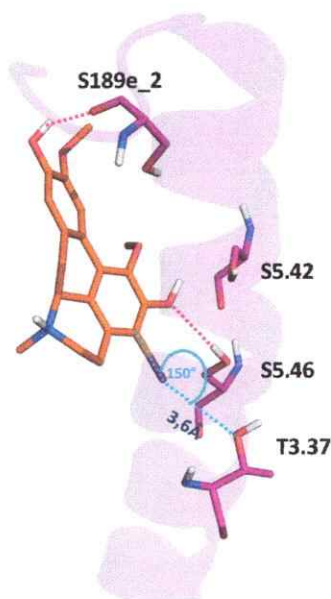
**Figura 30.** A la derecha visualización de la superposición de ambas orientaciones (posición 1: **P1**, posición 2: **P2**) de los complejos hD<sub>1/3</sub>-Xboldina obtenidas por simulación molecular utilizando AutoDock4. A la izquierda se encuentra la ampliación de la zona de interacción para ambas posiciones en el caso de la boldina

En ambas posiciones para boldina y sus derivado se observó que el ligando interacciona con D3.32 a través de la formación de un puente salino (3,2 Å en **P1**; 2,8 Å en **P2**). El residuo D3.32, como se comentó en la p.56, se considera referencial para la interacción de monoaminas con los GPCR del tipo dopaminérgico.

*En la posición 1:* El ligando posiciona sus hidroxilos hacia la TM V rica en residuos hidrofílicos. El hidroxilo en el C-2 (**Figura 31**), podría formar una interacción de tipo puente de hidrógeno, ya que el AM muestra un ángulo de 150° entre oxígeno y el hidroxilo de la S5.46. Por otro lado el hidrógeno del hidroxilo del C-9 se estabilizaría interactuando con el oxígeno carbonílico de la S189e\_2 (distancia entre ellos, 2 Å). Finalmente se observa una interacción aromática en forma

de T (distancia/ángulo; 5,46 Å/172°) entre los centroides del anillo D de la boldina y el grupo aromático del residuo F6.51 (Ver Anexo A, p. 182).

En cuanto a la eventual formación de un puente de halógeno entre el receptor y los derivados halogenados de boldina, si bien el programa Autodock 4.2 no es capaz de identificar esta interacción, el yodo en la 3-yodoboldina en **P1** se encuentra a una distancia de 3,6 Å del oxígeno hidroxílico de T3.37, cercana a la suma de sus radios de van der Waals (3,5 Å), formando un ángulo C-I...O de 150° que se aproxima suficientemente al óptimo teórico de 180° (**Figura 31**)(Auffinger y col., 2004).



**Figura 31.** Complejo hD<sub>1</sub>/3-yodoboldina, posición 1. Interacciones entre el segmento que comprende hidroxilos (línea punteada roja) y halógeno (línea punteada azul).

*En la posición 2:* Aquí la boldina direcciona sus dos hidroxilos hacia el espacio extracelular. Además se observó que su anillo D podría estar interactuando con W3.29 y W7.43 por medio de interacciones aromáticas en forma de T (Ver Anexo A, p. 182).

### *Dinámica molecular*

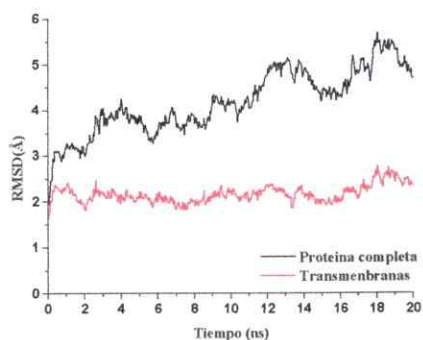
Para evaluar cual de las dos posiciones obtenidas por el AM sería la más estable se tomaron como puntos de partida para realizar una DM la boldina en la posición 1 y la 3-yodoboldina en la posición 2, que son las de menor energía en cada caso.

Los resultados de DM obtenidos para los complejos insertos en una bicapa lipídica dan cuenta de la estabilidad del sistema en un determinado intervalo de tiempo (20 ns). Para el complejo hD<sub>1</sub>/boldina (Figura 32 A , línea continua —) se observó que el valor de RMSD al considerar el receptor completo se mantuvo inicialmente cerca de los 3 Å, luego hasta los 12 nanosegundos aumentó hasta un máximo de 4 Å, y pasado este tiempo alcanzó valores de hasta 6 Å. Para el complejo hD<sub>1</sub>/3-yodoboldina (Figura 32 B, línea continua —) se observó que el valor de RMSD al considerar el receptor completo alcanza rápidamente un valor de 4,5 Å hasta los 8 nanosegundos, pasando luego y manteniéndose hasta el fin de la dinámica, con valores cercanos a 5,5 Å.

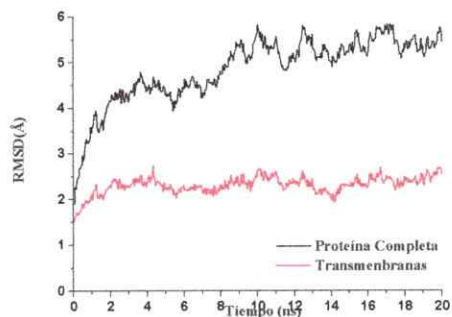
Las fluctuaciones observadas podrían indicar que ambos sistemas no logran estabilizarse en el transcurso de los 20 ns. Buscando evaluar el comportamiento del dominio transmembranar se determinó el valor de RMSD para cada sistema (Figura 32 A y B, línea continua, —), encontrándose que esta desviación fue en promedio de 2 Å, logrando estabilizarse rápidamente.

Los resultados anteriores indicarían que los altos valores de RMSD se generaron por los movimientos en los lazos intra y extracelulares. Estas fluctuaciones podrían responder al movimiento del ligando en el bolsillo (ver más adelante).

A)



B)

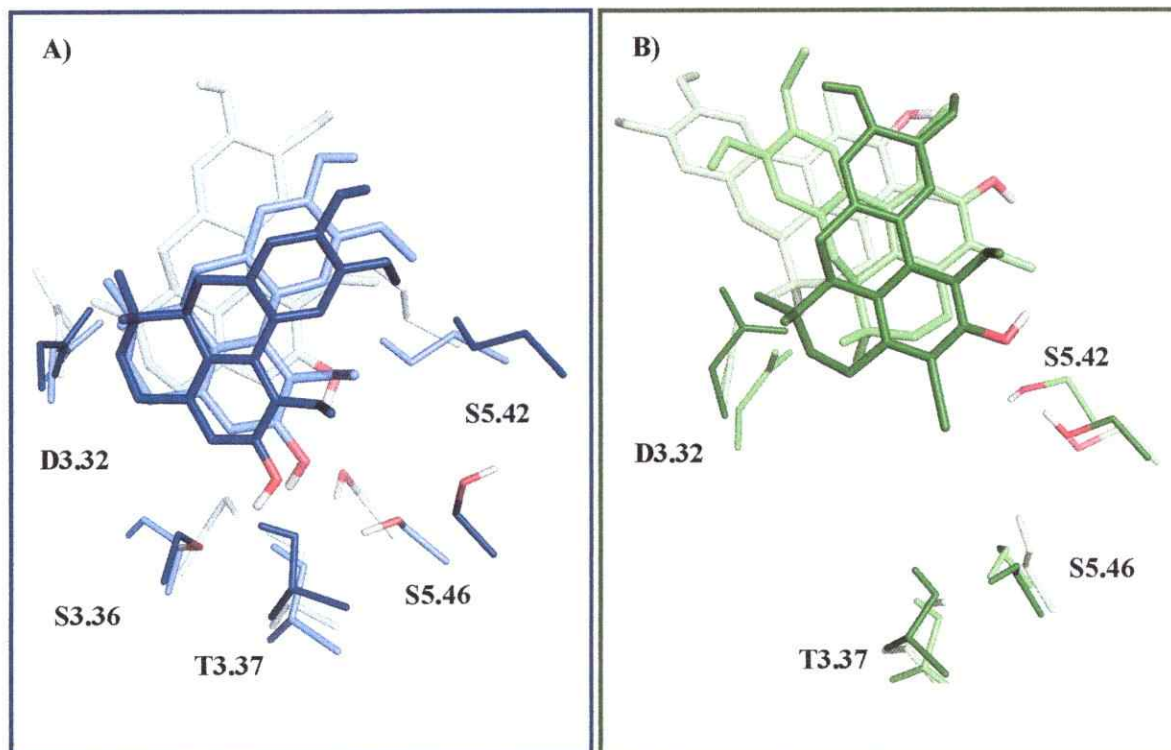


**Figura 32.** Gráficas de RMSD en función del tiempo de **A)** la boldina desde la posición 1 y de **B)** la 3-yodoboldina desde la posición 2.

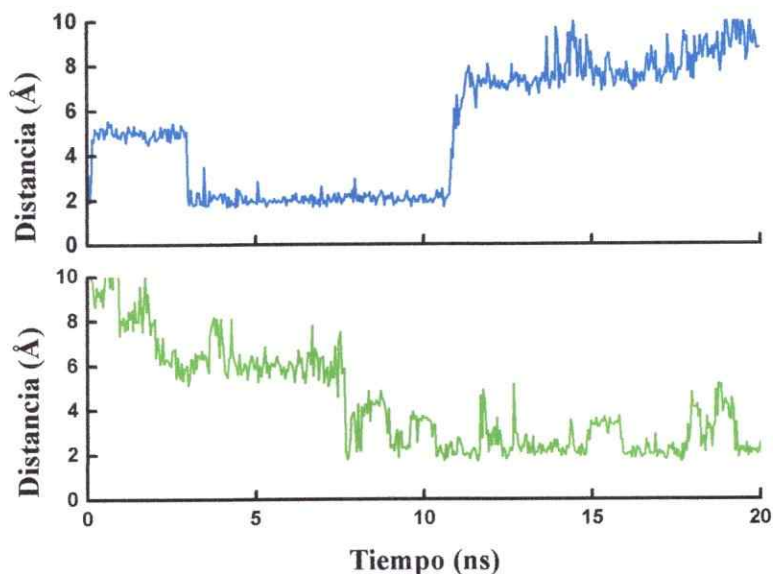
En ambos casos, si bien los ligandos permanecen en el bolsillo descrito anteriormente estos presentan un desplazamiento desde su posición inicial (**Figura 33**). Dentro de las interacciones observadas se mantiene constante la interacción entre el grupo amonio del ligando y D3.32. En el caso de la boldina el hidroxilo en el C-2 que inicialmente interactuaba con el hidroxilo de S5.46 ahora interactúa con el de S3.36. En el caso de la 3-yodoboldina el mismo hidroxilo ubicado en el C-2 que no mostraba ninguna interacción específica, tras los primeros nanosegundos de simulación establece puentes de hidrógeno con la cadena lateral de N6.56 y luego con el hidroxilo de S5.42.

A partir de los movimientos de la boldina y de la posición que adopta la 3-yodoboldina al finalizar el tiempo de dinámica (20 ns) se sugiere que con un mayor tiempo de simulación el derivado halogenado tal vez podría seguir rotando y posicionarse igual que la boldina o establecerse en esa posición. Al observar la evolución de la distancia entre el hidroxilo en el C-2 en ambas moléculas y el hidroxilo de la S5.42 (**Figura 33**), donde el derivado yodado permanece por más tiempo en la posición **P1** que la boldina, se postula que posiblemente la

instalación de la 3-yodoboldina en **P1** podría estar determinada por la presencia del halógeno, lo que podría incidir en algo más que la afinidad.

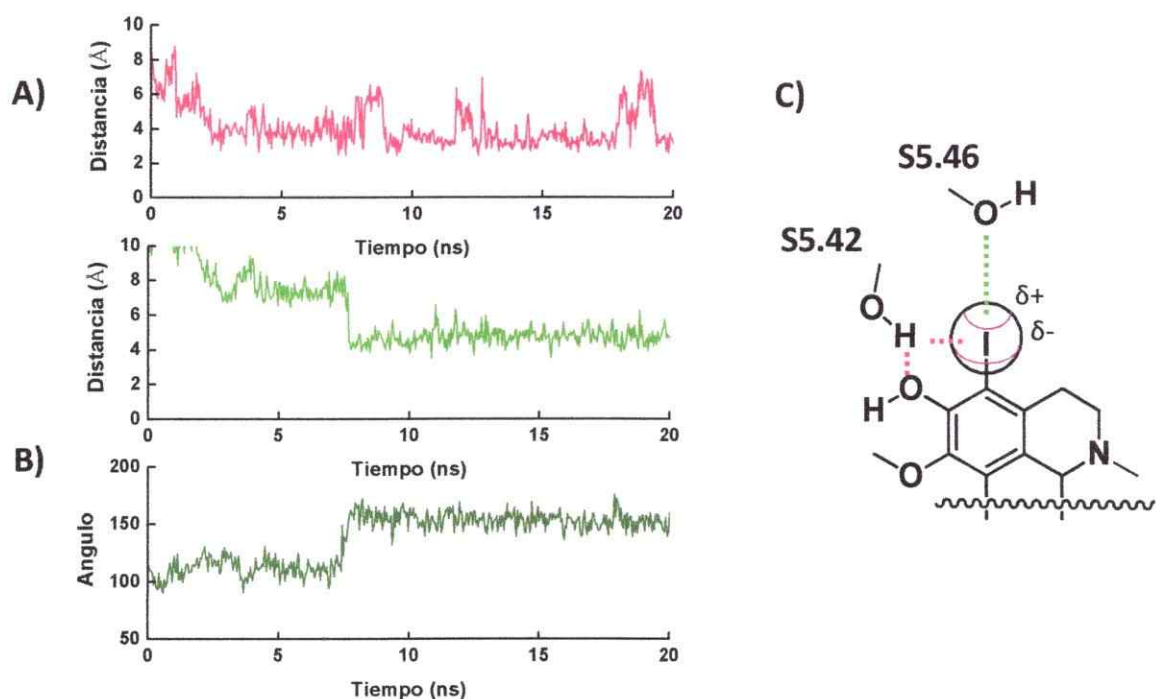


**Figura 33.** Cambio de posición observado en el transcurso de la DM de **A)** la boldina y de **B)** la 3-yodoboldina en el hD<sub>1</sub>. Boldina: 2ns/celeste, 12ns/azul y 20ns/azul oscuro; 3-yodoboldina: 0ns/verde agua, 4ns/verde limón y 20ns/verde olivo. El oxígeno y el hidrógeno del hidroxilo del C-2 de la boldina y del residuo S5.42 señalados en el gráfico de distancia versus tiempo de la **Figura 34** se representan con los colores rojo y blanco respectivamente.



**Figura 34.** Evolución de la distancia entre el hidroxilo ubicado en el C-2 de la boldina (azul) y de la 3-yodoboldina (verde) y el hidroxilo de S5.42.

Al estudiar las distancias entre el yodo de la 3-yodoboldina y los residuos que lo rodean se observó que, una vez que se estabiliza la dinámica, el yodo se encuentra a 4 Å del hidrógeno del hidroxilo de S5.42 (**Figura 35 A**, línea rosada) y del oxígeno hidroxílico de S5.46 (**Figura 35 A**, línea verde) donde además el ángulo observado en esta última posición (C3—I $\cdots$ O<sub>H</sub>S5.46) se aproxima a los 160° (**Figura 35 B**, línea verde olivo). Considerando lo comentado anteriormente y el hecho que la DM no es capaz de leer la anisotropía particular de los halógenos, se propone que el yodo ubicado en el C-3 interaccionaría con el receptor formando un puente de hidrógeno con el hidrógeno del hidroxilo de S5.42 y un puente de halógeno con el oxígeno hidroxílico de S5.46 (**Figura 35 C**).

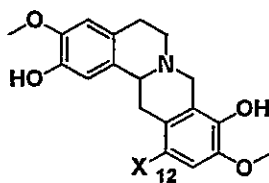


**Figura 35.** **A)** Gráfico de distancia versus tiempo entre el yodo de la 3-yodoboldina y el hidrógeno del hidroxilo de S5.42 (—) y el oxígeno hidroxílico de S5.46 (—). **B)** Gráfico del ángulo C3—I...O<sub>H</sub>S5.46 versus tiempo. **C)** Propuesta de interacción de la 3-yodoboldina con el hD<sub>1</sub> por medio del yodo. En línea punteada rosada: interacción de puente de hidrógeno y en línea punteada verde: interacción de puente de halógeno.

En la búsqueda de la posible interacción por puente de halógeno se vio que los tres programas de simulación molecular utilizados reconocen la presencia del halógeno reproduciendo la influencia que tiene la sustitución con tipo de átomos en las constantes de afinidad al compararlas con la del ligando no sustituido. Para establecer si la relación observada se debe a la presencia de un puente de halógeno o al aporte hidrofóbico que puede hacer este tipo de átomos a la molécula, se debe utilizar un conjunto de constantes de afinidad con una tendencia como las observadas en el estudio con inhibidores de la catepsina L humana (ver introducción p.11). En cuanto a decidir si

los derivados halogenados de la boldina interactúan con el D<sub>1</sub> mediante puentes de halógeno, con solo las constantes de afinidad determinadas es imposible. Para ello, considerando el comportamiento observado en DM de la boldina y de la 3-yodoboldina, se cree que nuevos experimentos de afinidad y actividad de la boldina y sus derivados 3-Xboldina (X = F, Cl, Br, I y Me) en el D<sub>1</sub> podrían dar luces para establecer definitivamente la presencia o ausencia del puente de halógeno en la interacción ligando/proteína.

De acuerdo a lo planteado en uno de los objetivos se cree que el sistema hD<sub>1</sub>/12-halogenoescoulerina presenta características que podrían ser aptas para desarrollar el estudio de una eventual participación de los puentes de halógeno en la interacción receptor-ligando (**Figura 36, Tabla 15**) dado el similar aumento de afinidad que se produciría por cloración comparado con catepsina. A partir de lo anterior se realizó la síntesis del derivado clorado y el bromado de escoulerina en el C-12 (ver más adelante p. 135). A ellos se les determinó las constantes de afinidad con respecto al D<sub>1</sub> (**Tabla 15**), observándose que entre el derivado clorado y bromado no existe una diferencia, como lo observado en el estudio de la catepsina L humana, que se explique por la presencia de un puente de halógeno. Sin embargo, sería necesario sintetizar y evaluar biológicamente (determinación de afinidad y actividad) otros derivados de escoulerina sustituidos en el C-12 con grupos incapaces de formar puentes de halógeno pero con propiedades hidrofóbicas similares.



**Figura 36.** Estructura de la escoulerina con la posición 12 destacada, donde “X” representa un sustituyente tal como halógeno.



**Tabla 15.** Constantes de afinidad en el receptor D<sub>1</sub> para las 12-Xescoulerinas.

| 12-Xescoulerina | D <sub>1</sub> K <sub>i</sub> (nM) |      |
|-----------------|------------------------------------|------|
|                 | Referencia <sup>1</sup>            | 2015 |
| H (32a)         | 42                                 | ---  |
| Cl (32c)        | 8,9                                | 1,3  |
| Br (32b)        | ---                                | 1,9  |

<sup>1</sup>(Jiao y col., 2007)*Acoplamiento molecular de 4-halogeno3MOD*

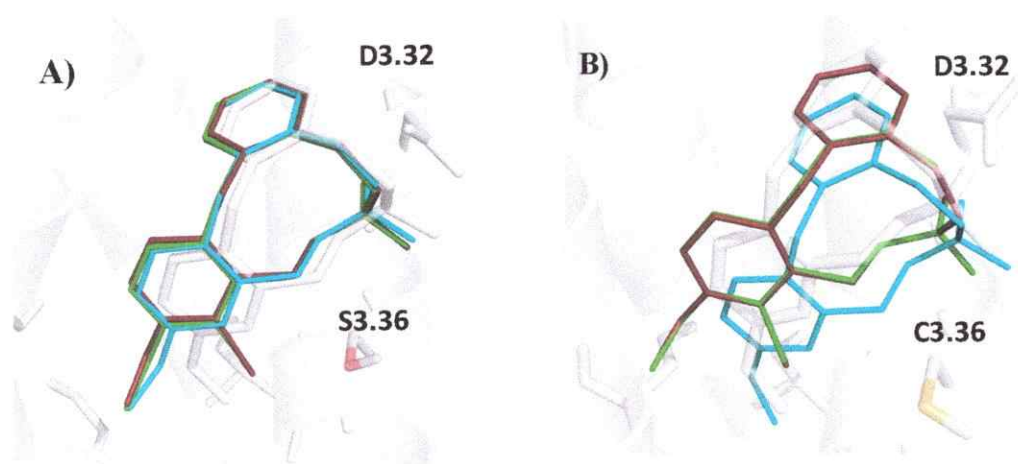
Antes de pasar al análisis del acoplamiento molecular de las propuestas de modificación de 3MOD en el C-4 (4-halogeno3MOD) se comenta, según lo planteado en los objetivos de sintéticos, que se realizó la síntesis de 4-cloro3MOD (3b) y 4-bromo3MOD (3c) (ver más adelante p. 104) obteniéndose sus constantes de afinidad por los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> (Tabla 16). En ellas se observó que la afinidad de 3MOD por hD<sub>1</sub> es 4 veces mayor de lo informado previamente (Mohr y col., 2006), que la halogenación en el C-4 de 3MOD aumenta al doble la afinidad por el hD<sub>1</sub> cuando el halógeno es cloro o bromo y que al pasar de cloro a bromo la selectividad por el hD<sub>1</sub> sobre hD<sub>2</sub> aumento de 5 a 9 veces. El efecto de la halogenación sobre la afinidad por el hD<sub>2</sub> no cambia de manera significativa, salvo una posible disminución cuando el halógeno es bromo.

**Tabla 16.** Constantes de afinidad de 3MOD y sus derivados halogenados en el C-4 sintetizados.

| Compuesto        | hD <sub>1</sub>     | hD <sub>2</sub> |
|------------------|---------------------|-----------------|
|                  | K <sub>i</sub> (nM) |                 |
| 3a <sup>1</sup>  | 28,5 ± 9,7          | 13,0 ± 9,0      |
| 3a               | 6,9 ± 0,8           | 17,9 ± 0,9      |
| 3b (4-cloro3MOD) | 2,9 ± 0,8           | 15,5 ± 0,8      |
| 3c (4-bromo3MOD) | 2,9 ± 0,7           | 27,4 ± 0,9      |

<sup>1</sup>(Mohr y col., 2006)

De acuerdo a los resultados anteriores se realizó el acoplamiento de 4-cloro3MOD y 4-bromo3MOD por medio del programa AutoDock4 utilizando los modelos de los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> relajados con 3MOD por 20 ns. En el acoplamiento molecular se observó (Figura 37) que la presencia del halógeno no influye en la posición que adopta el ligando dentro del sitio de interacción. Los derivados 4-halógeno3MOD permanecen en la misma posición que 3MOD, encontrándose el halógeno direccionado hacia el residuo S(C)3.36. Las energías entregadas por el programa AutoDock 4 (Tabla 17), en el caso del hD<sub>1</sub> muestran una tendencia similar a las constantes de inhibición presentadas en la Tabla 16, pero en el caso del hD<sub>2</sub> esto no sucede.

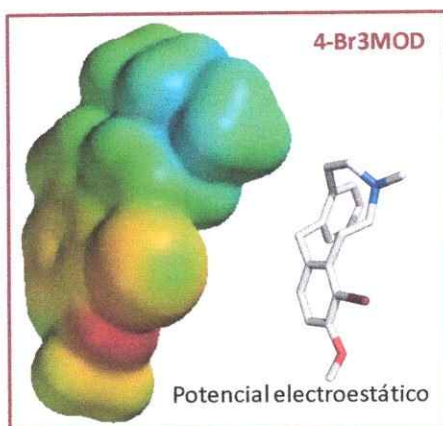


**Figura 37.** Acoplamiento molecular de 3MOD (autodock/Cyan, DM/Banco) y derivados 4-halógeno3MOD (Cloro/verde y Bromo/burdeos) en **A)** hD<sub>1</sub> y **B)** hD<sub>2</sub>.

**Tabla 17.** Energías de acoplamiento molecular de 3MOD y derivados 4-halógeno3MOD en el hD<sub>1</sub> y en el hD<sub>2</sub>.

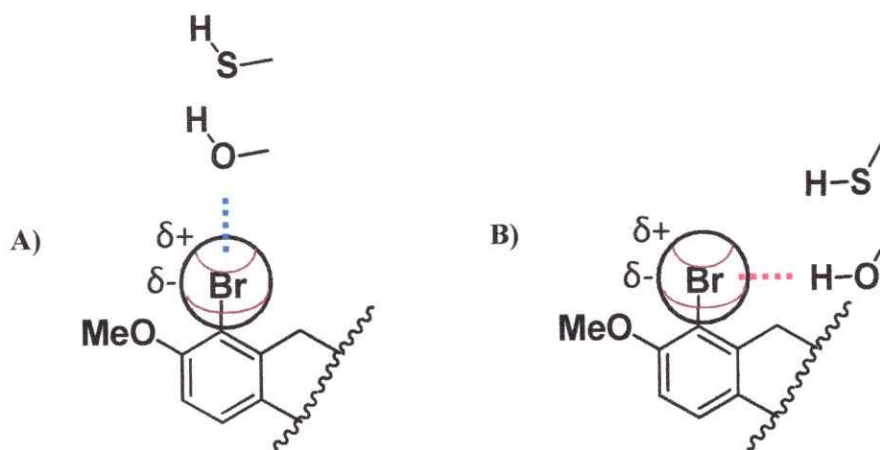
| Compuesto | hD <sub>1</sub>       | hD <sub>2</sub> |
|-----------|-----------------------|-----------------|
|           | $\Delta G$ (kcal/mol) |                 |
| 3a        | -7,88                 | -7,62           |
| 3b        | -8,41                 | -7,76           |
| 3c        | -8,41                 | -7,85           |

Para evaluar el efecto de la presencia del halógeno en el C-4 de 3MOD se realizó un cálculo del potencial electrostático de 4-bromo3MOD (**Figura 38**) observándose que existe una región de menor densidad electrónica en el extremo libre del bromo, sugiriendo la formación de un "σ-hole".



**Figura 38.** Potencial electrostático de 4-bromo3MOD

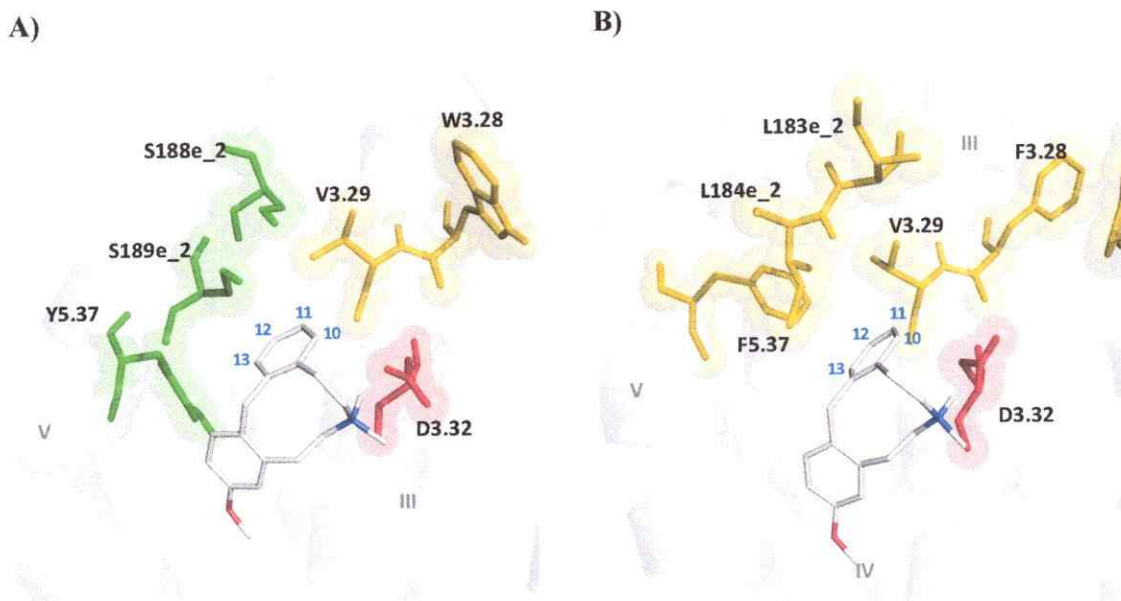
De acuerdo a lo anterior y considerando la orientación del halógeno hacia el residuo S(C)3.36, se postula que puede ocurrir una sinergia entre una interacción de tipo puente de halógeno (**Figura 39 A**) y una de tipo puente de hidrógeno (**Figura 39 B**) entre el halógeno en el C-4 de 3MOD y el segmento -O(S)H del residuo en 3.36. La sinergia propuesta puede explicar el aumento de afinidad observado en hD<sub>1</sub>. En cambio, la menor estabilidad de un puente de halógeno X-S y/o el efecto estérico producido por la presencia de azufre en el residuo C3.36 en hD<sub>2</sub> (Volumen<sub>(OH)</sub>=17 Å<sup>3</sup>; Volumen<sub>(SH)</sub>=27 Å<sup>3</sup>) podrían explicar el descenso en la afinidad con respecto a el hD<sub>2</sub> y por ende el aumento de la selectividad por el hD<sub>1</sub> al aumentar el tamaño del halógeno.



**Figura 39.** Propuesta de interacción entre el Br de 4-bromo3MOD y el segmento -O(S)H del residuo en 3.36. En la imagen se muestra una representación de la anisotropía de la distribución de carga del bromo observada mediante el cálculo del potencial electrostático (**Figura 38**). **A)** Puente de halógeno y **B)** puente de hidrógeno.

### Potenciales modificaciones del anillo B de la 3MOD

Los átomos de carbono del anillo B están rodeados por un lado de residuos conservados u homólogos presentes en la parte superior de las TM II, III y V, como también por residuos de diferentes características fisicoquímicas presentes en el segmento fijo del e<sub>2</sub> (**Figura 40**). La modificación del anillo B de la 3MOD podría mejorar su afinidad en ambos receptores al potenciar la interacción con los residuos conservados y también podría generar ligandos selectivos entre ambos receptores al potenciar las interacciones con e<sub>2</sub>. De acuerdo a lo anterior se proponen las siguientes modificaciones según el entorno fisicoquímico que rodea los carbonos del anillo B (**Figura 41 y 42**).



**Figura 40.** Residuos que se direccionan hacia los átomos de carbono del anillo B en el complejo formado entre: **A)** hD<sub>1</sub>/3MOD y **B)** hD<sub>2</sub>/3MOD. Estos se colorean de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas como: hidrofílico/verde, hidrofóbico/amarillo, cargado positivamente/azul y cargado negativamente/rojo.

*Propuestas según:*

• Residuos conservados u homólogos (**Figura 41**):

-Los carbonos C-10 y C-11 se encuentran a ~4 Å del segmento cargado de D3.32, por lo cual se podrían incluir en esta posición grupos donadores de puente de hidrógeno (-NH<sub>2</sub> o -OH) y/o de baja densidad electrónica (-NHR, donde R sea un grupo electrón aceptor).

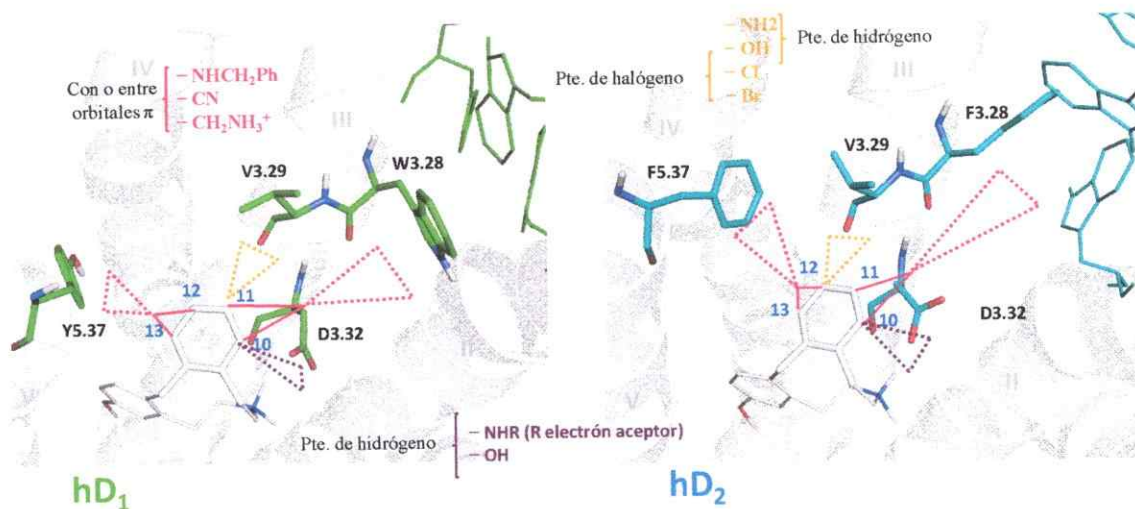
-Los carbonos C-12 y C-13 se encuentran a ~5 Å de la cadena lateral del residuo aromático Y(F)5.38 y los carbonos C-10 y C-11 a ~9Å del inicio de un bolsillo aromático (dado por el residuo F(W)3.28) entre los segmentos superiores de las TM III y TM II. En todos los casos se podrían incluir grupos de características hidrofóbicas y/o capaces de generar interacciones con o

entre los orbitales  $\pi$  de los residuos involucrados De acuerdo a lo anterior y considerando el volumen disponible en la cavidad se propone que en los C-12 y C-13 se podrían incluir grupos pequeños como por ejemplo -CN y en los C10 y C-11 grupos más voluminosos como por ejemplo un bencilo o incluso grupos cargados positivamente como  $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$  con los cuales generar interacciones de tipo catión- $\pi$ .

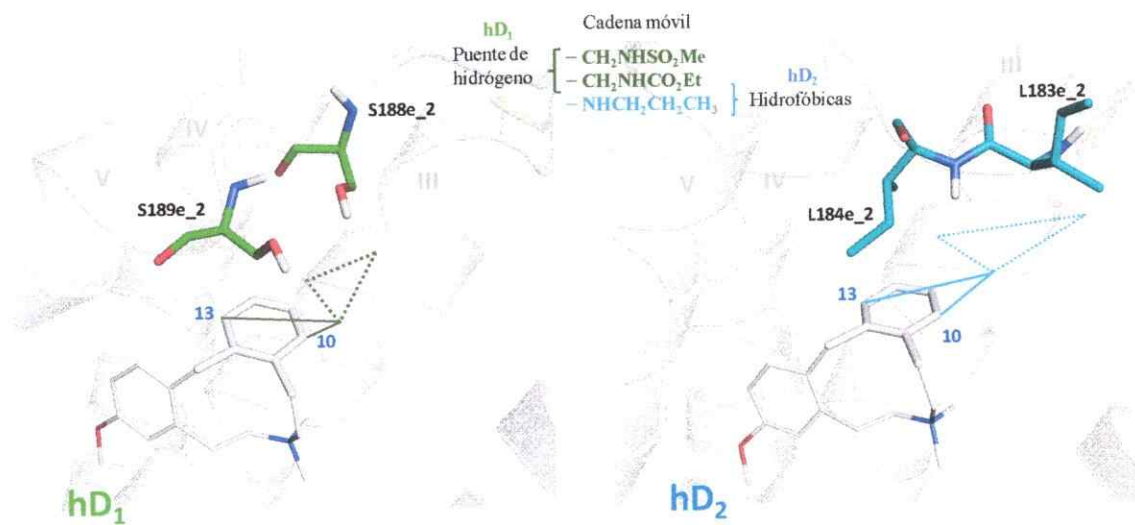
-El carbono C-11 en el hD<sub>1</sub> y el C-12 en el hD<sub>2</sub> se encuentran a  $\sim 4$  Å del oxígeno carbonílico del enlace peptídico entre V3.29 y A(T)3.30. A partir de esta distancia se propone que un grupo pequeño generador de puente de hidrógeno (-NH<sub>2</sub> o -OH) o de halógeno (-Cl o -Br) podría interaccionar selectivamente con el segmento destacado.

• Residuos no conservados (**Figura 42**):

El anillo B de la 3MOD, según lo observado no presenta ninguno de sus carbonos orientado específicamente hacia el e<sub>2</sub>. Para potenciar por lo tanto interacciones con este segmento se propone incluir sustituyentes flexibles, de tal modo que puedan modificar su conformación y ubicarse en el bolsillo generado por los residuos del e<sub>2</sub>. Para potenciar la selectividad entre los receptores se podría por un lado incluir sustituyentes que sean capaces de generar puentes de hidrógeno con el e<sub>2</sub> del hD<sub>1</sub>, como por ejemplo sustituyentes del tipo aceptor de puentes de hidrógeno como los incluidos en la derivatización de SCH-39166 (-NHSO<sub>2</sub>, -NHCOEt) (Qiang y col., 2010) y por otro sustituyentes que generen interacciones hidrofóbicas con el e<sub>2</sub> del hD<sub>2</sub>, tales como  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ .



**Figura 41.** Propuestas de derivados de 3MOD que mejorarían su afinidad en ambos receptores.

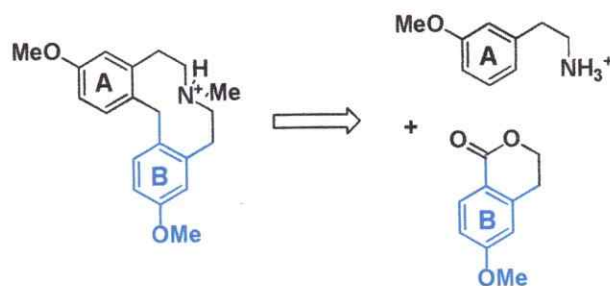


**Figura 42.** Propuestas de derivados de 3MOD que mejorarían su selectividad hacia el hD<sub>1</sub> a través de puente de hidrógeno y hacia el hD<sub>2</sub> por interacciones de tipo hidrofóbico.

### *Factibilidad sintética de los derivados propuestos*

Si bien es probable que las modificaciones propuestas incrementen la afinidad y/o la selectividad entre los RD, es necesario considerar las posibilidades sintéticas de la obtención de los derivados mencionados. Para ello se toma en cuenta la síntesis del único derivado de 3MOD informado, el cual presenta un grupo metoxilo en el C-11 (Mohr y col., 2006). En su obtención se utilizó el precursor isocromanona previamente modificado (**Figura 43**). Considerando lo anterior y la versatilidad sintética que se requiere para incluir los sustituyentes de las diferentes características propuestas, se plantea incluir en la isocromanona un grupo derivado de nitrógeno: amino o nitro. Según los antecedentes de síntesis de isocromanonas derivatizadas con un grupo nitrogenado, los compuestos nitrados en las posiciones C-5 y C-6 (los que corresponden en 3MOD al C-10 y al C-11) son los más referenciados (Kozikowski y col., 1980; Somei y col., 1981; Sakamoto y col., 1986; Matsui y col., 1992; McDonald y col., 2000; Antoine y col., 2008). Lo anterior nos indicaría una mayor probabilidad de obtener las isocromanonas nitradas en C-5 y C-6, por lo cual son los derivados de 3MOD modificados en el C-10 y en el C-11 los que se propone estudiar en esta primera instancia. Además, para incluir mayor flexibilidad en los sustituyentes mencionados, se propone alargar en un carbono la unión entre  $-NR_2$  y el anillo aromático B. Esta extensión de la cadena se realizaría por medio de dos pasos sintéticos: primero la transformación de  $-NH_2$  en  $-CN$  y después la reducción del grupo  $-CN$ .





**Figura 43.** Retrosíntesis simplificada del único derivado de 3MOD con sustitución en el anillo B.

### Evaluación por simulación molecular de las propuestas de modificación del anillo B de la 3MOD

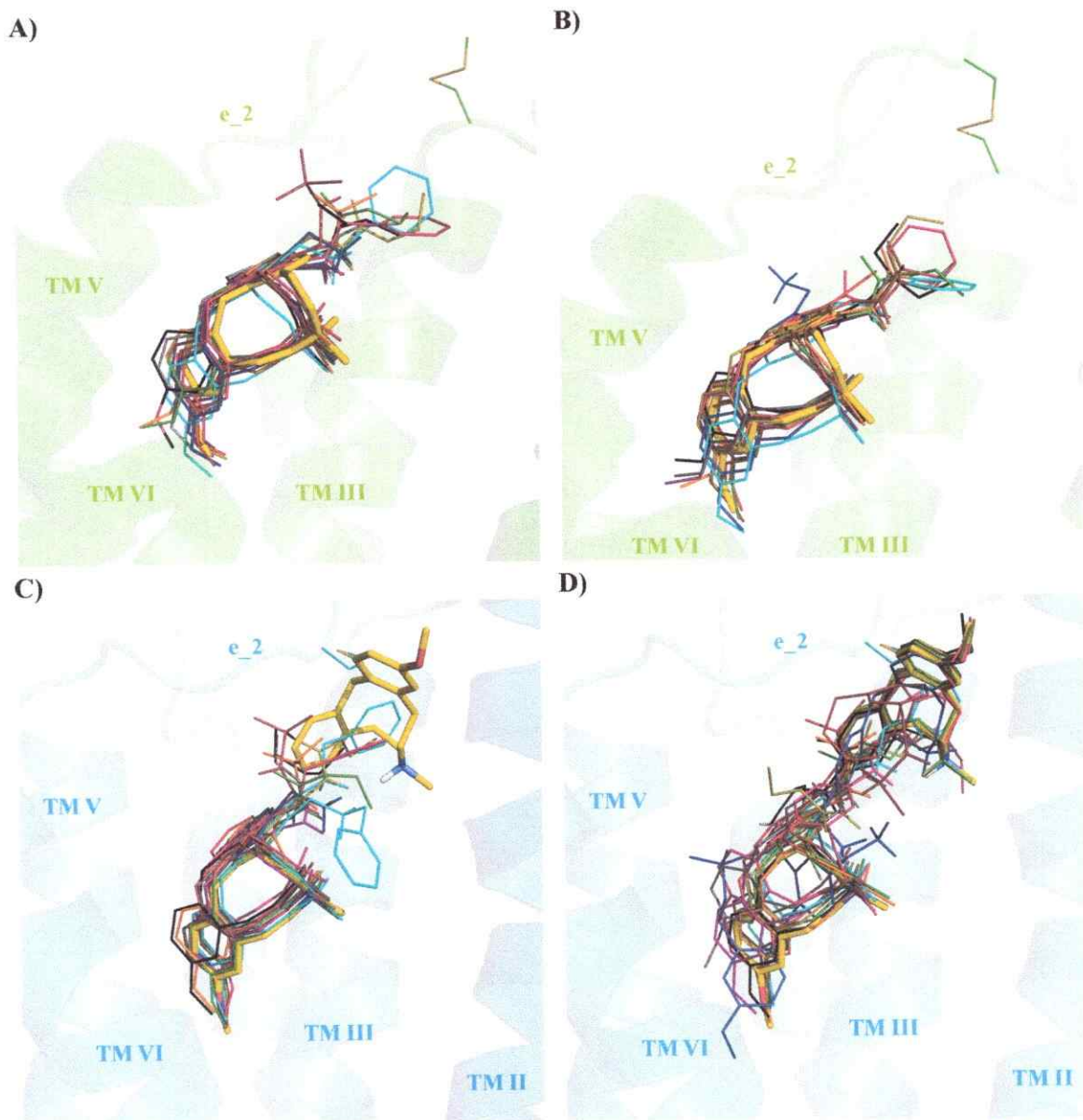
En esta sección se realiza un análisis del acoplamiento molecular de las propuestas de modificación en el C-10 y en el C-11, las que sumadas a la propuesta de extensión del grupo  $-NH_2$  dan en total 22 derivados. Para analizar los resultados de acoplamiento molecular se tomó en consideración las características donadoras oceptoras de densidad electrónica del sustituyente incluido en el anillo B.

En la **Tabla 18** se entregan los valores de energía de los complejos obtenidos utilizando metodologías de acoplamiento molecular. Es posible observar que en todos los casos para los receptores  $hD_1$  y  $hD_2$  los valores son negativos, indicando que es posible obtener interacciones en las cavidades de los dos receptores. Adicionalmente en la **Figura 44** se muestra la superposición de las conformaciones finales de todos los ligandos en ambos receptores, donde se puede destacar que el bolsillo preferente es el mismo en todos los casos.

Tabla 18. Resultados de acoplamiento molecular

| N° | R  | hD <sub>1</sub> | hD <sub>2</sub>            |
|----|--|-----------------|----------------------------|
|    |  | ΔG (kcal/mol)   |                            |
| 3a | H  | -6,44           | (-6,50/-6,32) <sup>a</sup> |
| 3d | 10NH <sub>2</sub>                                  | -7,25           | -6,76                      |
| 3e | 11NH <sub>2</sub>                                  | -6,78           | -6,50                      |
| 3f | 10NHBn   | -9,59           | -8,29                      |
| 3g | 11NHBn   | -8,82           | -8,80                      |
| 3h | 10CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>     | -8,11           | -8,27                      |
| 3i | 11CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>     | -6,56           | (-7,30/-7,13) <sup>a</sup> |
| 3j | 10CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> Bn  | -9,74           | (-9,38/-9,17) <sup>a</sup> |
| 3k | 11CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> Bn  | -8,69           | -9,64                      |
| 3l | 10NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -7,86           | -6,73                      |
| 3m | 11NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -7,66           | (-7,59/-7,30) <sup>a</sup> |
| 3ñ | 10NCH(Et) <sub>2</sub>                             | -8,15           | -7,44                      |
| 3n | 11NCH(Et) <sub>2</sub>                             | -8,08           | -7,90                      |
| 3o | 10CN   | -7,42           | -7,18                      |
| 3p | 11CN   | -7,36           | -7,78                      |
| 3q | 10NHCO <sub>2</sub> Et                             | -7,97           | -7,16                      |
| 3r | 11NHCO <sub>2</sub> Et                             | -7,39           | (-6,61/-6,49) <sup>a</sup> |
| 3s | 10NHSO <sub>2</sub> Me                             | -7,13           | -6,16                      |
| 3t | 11NHSO <sub>2</sub> Me                             | -6,27           | -5,80                      |
| 3u | 10CH <sub>2</sub> NHCO <sub>2</sub> Et             | -8,26           | -7,67                      |
| 3v | 11CH <sub>2</sub> NHCO <sub>2</sub> Et             | -7,78           | -6,76                      |
| 3w | 10CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> Me             | -6,43           | -6,24                      |
| 3x | 11CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> Me             | -6,66           | -6,02                      |

<sup>a</sup> Energías de posiciones con igual probabilidad.



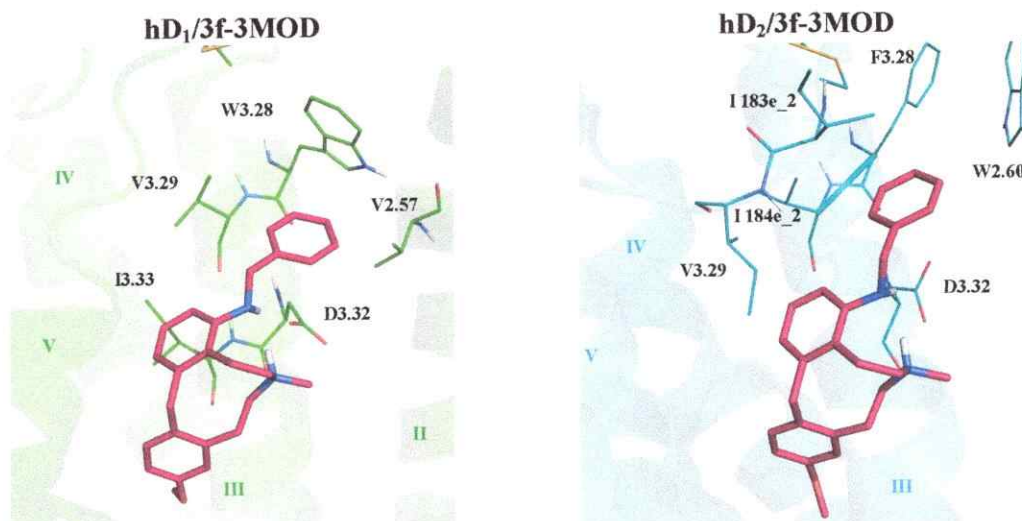
**Figura 44.** Acoplamiento molecular de derivados de la 3MOD donde el sustituyente R (**H**, **NH<sub>2</sub>**, **NHBn**, **CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>**, **CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>Bn**, **NCH(Et)<sub>2</sub>**, **NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>**, **CN**, **NHCO<sub>2</sub>Et**, **NHSO<sub>2</sub>Me**, **CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>Et**, **CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>Me**) se encuentra en la posición 10 u 11 y el modelo de el hD<sub>1</sub> se encuentra coloreado verde y del hD<sub>2</sub> celeste. **A)** Complejos hD<sub>1</sub>/3MOD-R en la posición 10, **B)** Complejos hD<sub>1</sub>/3MOD-R en la posición 11, **C)** Complejos hD<sub>2</sub>/3MOD-R en la posición 10 y **D)** Complejos hD<sub>2</sub>/3MOD-R en la posición 11.

Los resultados muestran que existe una menor dispersión de las posiciones de los derivados de la 3MOD cuando se encuentran complejados con el hD<sub>1</sub> que con el hD<sub>2</sub>. Además en algunos acoplamientos con el complejo hD<sub>2</sub> adquiere importancia una posición secundaria obtenida en el AM de la 3MOD una vez relajado (Anexo A, p. 183).

#### *Sustituyentes con carácter electrón-donoras*

De los derivados estudiados, los que poseen mayor efecto donador de densidad electrónica sobre el anillo B (todas las conformaciones y posiciones, Anexo p. 184-7), de acuerdo a los valores de sus constantes  $\sigma$  de Hammett (Graham, 1995), son los derivados **3d** y **3e**. Las energías obtenidas en ambos receptores, con estos derivados, son bastante similares a las que se obtienen con el compuesto no derivatizado. Si bien los otros derivados con efecto donador disminuyeron su energía de acoplamiento, se establece de acuerdo al resultado anterior que el efecto observado no es debido a su capacidad donante si no al incremento de interacciones de tipo van der Waals (vdW) en el bolsillo que rodea al anillo B (Figura 45).

Para los derivados **3j**, **3k**, **3l** y **3m** se le suma al efecto de tipo vdW un incremento de la energía de la interacción de tipo salino existente entre el derivado y el receptor por medio de D3.32.



**Figura 45.** Ejemplo del complejo formado entre el hD<sub>1</sub> (verde) o el hD<sub>2</sub> (celeste) y los derivados de la 3MOD con efecto electrodonor del sustituyente. Derivado utilizado: **3f**. Se destaca por enlaces gruesos la 3MOD y enlaces delgados a los residuos que rodean al sustituyente. En números romanos el numero de la TM.

#### *Sustituyentes con carácter electrón-atractor*

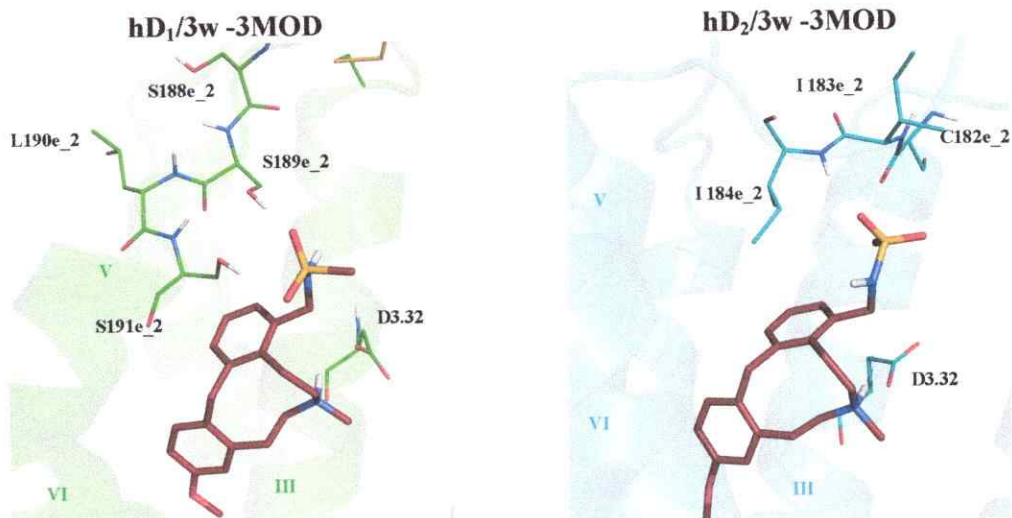
En cuanto a los derivados con efecto electroatractor del sustituyente (todas las conformaciones y posiciones Anexo p. 188-90) según los parámetros  $\sigma$  de Hammett, los compuestos **3o**, **3p**, **3q**, **3r**, **3s** y **3t** serían similares. En los derivados **3u**, **3v**, **3w** y **3x**, por otro lado, disminuye el efecto atractor de densidad electrónica desde el anillo B por la presencia del grupo metileno. En la **Figura 46** se encuentra el derivado **3w** tomado como ejemplo de los complejos formados con los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>.

Al observar las energías de este grupo de derivados en general existe un incremento en la afinidad por el hD<sub>1</sub> comparándolo con el hD<sub>2</sub>. Además la atracción de densidad electrónica del carbonilo o sulfóxido desde su grupo amida, como también la posición de esta última con

respecto a D3.32, genera una doble interacción con el ligando similar a la observada con los derivados donadores de densidad electrónica.

Otra interacción que fue observada en algunos casos es el puente de hidrógeno generado entre los derivados carbamida y sulfamida con el e<sub>2</sub>. Esta interacción en el hD<sub>2</sub> se ve entre el oxígeno del carbonilo del grupo amida del enlace peptídico de los residuos I183e<sub>2</sub> e I184e<sub>2</sub> y el sustituyente de los derivados 3s, 3t, 3w y 3x. En el hD<sub>1</sub> se genera esta interacción entre el hidroxilo de la cadena lateral de S189e<sub>2</sub> y los derivados 3q, 3s y 3w. En el caso de este último derivado el puente de hidrógeno es doble e incluye el hidroxilo de S191e<sub>2</sub>. Si bien, como se mencionó anteriormente, esta interacción solo se presentó de manera clara en algunos derivados, se podría desarrollar en todos los compuestos de este tipo debido a la relativa flexibilidad de este segmento del e<sub>2</sub>.

Aun cuando en términos de energía no existe una diferencia a considerar entre los derivados analizados anteriormente, sí existe diferencia en la posibilidad de desarrollar la interacción con el e<sub>2</sub>. El puente de hidrógeno observado podría depender de la disponibilidad de los grupos donores de puente de hidrógeno presentes en cada receptor, donde el hD<sub>1</sub> tiene más posibilidades que el hD<sub>2</sub>. Esta característica podría conducir a cierta selectividad de los derivados por el hD<sub>1</sub> respecto al hD<sub>2</sub>.



**Figura 46.** Ejemplo del complejo formado entre el hD<sub>1</sub> (verde) o el hD<sub>2</sub> (celeste) y los derivados de la 3MOD con efecto electroatractor del sustituyente. Derivado utilizado: **3w**. Se destaca por enlaces gruesos la 3MOD y enlaces delgados a los residuos que rodean al sustituyente. En números romanos el numero de la TM.

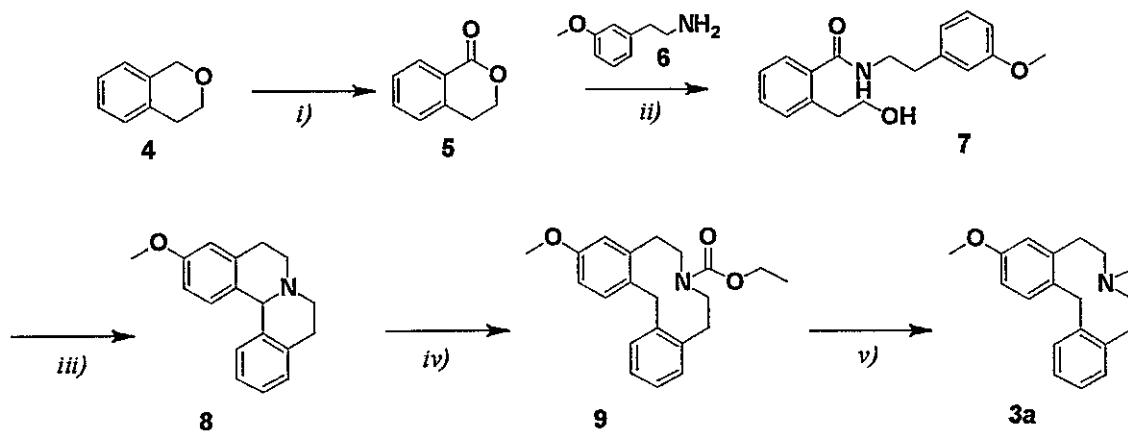
A partir de los resultados anteriores se predice que la inclusión de sustituyentes en el C-10 y en el C-11 del anillo B de la 3MOD con cadenas hidrofóbicas aumentaría la afinidad en ambos receptores. Además se observó que la inclusión de grupos de tipo sulfamida generaría interacciones específicas y distintas en ambos receptores que podrían generar selectividad entre un receptor y el otro.

## Resultados y Discusión

### SÍNTESIS ORGÁNICA

#### Síntesis de 3MOD

Con el objeto de obtener nuevos derivados de 3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (3MOD) modificados en el C-4, se propuso sintetizar inicialmente 3MOD y posteriormente realizar su derivatización. Para ello se formuló una ruta sintética basada en diferentes investigaciones desarrolladas por el grupo de Lehmann (Figura 47) (Hoefgen y col., 2006; Lehmann y col., 2006; Mohr y col., 2006; Robaa y col., 2011). En ellas, se obtenía 3MOD o compuestos análogos por medio de 4 pasos sintéticos, partiendo desde la isocroman-1-ona (5) y la 3-metoxifeniletilamina (6) o similares.



**Figura 47.** Ruta de síntesis de 3MOD. *i)* DCM,  $\text{KMnO}_4$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , ultrasonido; *ii)*  $120^\circ\text{C}$ , 24 h.; *iii)* 1-.  $\text{POCl}_3$ ,  $120^\circ\text{C}$ ; 2-. MeOH,  $\text{NaBH}_4$ , reflujo, 0,5 h.; *iv)* 1-.  $\text{ClCO}_2\text{Et}$ ,  $\text{THF}_{(\text{seco})}$ ,  $-65^\circ\text{C}$ , 4 h.; 2-.  $\text{NaCNBH}_3$ , THF,  $-65^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$ ; *v)*  $\text{LiAlH}_4$ , THF,  $25^\circ\text{C}$ .



En el presente trabajo la isocroman-1-ona (**5**) se obtuvo con un rendimiento de 75% a partir de la oxidación en mezcla heterogénea del compuesto **4**. Su caracterización se realizó por medio de espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  donde la integración y el desplazamientos químicos de los picos observados correspondió a lo informado (Silvestre y Salvador, 2007).

La oxidación en mezcla heterogénea utilizó como oxidante una mezcla 1:1 de  $\text{KMnO}_4$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . El método originalmente propuesto utilizó ultrasonido en forma de pulso como fuente de irradiación (Mečiarova y col., 2000). En aquella investigación se estudiaron diferentes compuestos aromáticos sustituidos con cadenas alifáticas, entre ellos el compuesto **4** que se oxidó al **5** con rendimiento y conversión cuantitativos. A diferencia de la metodología descrita en la referencia, en este trabajo se utilizó un equipo de ultrasonido convencional de irradiación continua, observándose cambios en los resultados al escalar los moles de reacción (Tabla 19).

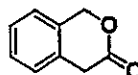
**Tabla 19.** Resultados de la reacción de oxidación del compuesto **4**.

| N°  | Condiciones de reacción <sup>a</sup> |      |            | Observación  |
|-----|--------------------------------------|------|------------|--|
|     | mmol de <b>1</b>                     | T °C | Tiempo (h) |  |
| I   | 0,7                                  | 40   | 3,5        | 100% de conversión a <b>5</b> observado por CCF y 97% aislado              |
| II  | 2,5                                  | 40   | 4          | Conversión incompleta, 83% aislado, producto secundario                    |
| III | 7,4                                  | 40   | 6          | Conversión incompleta, 66% y 75% <sup>b</sup> aislado, producto secundario |
| IV  | 2,5                                  | 20   | 4          | Detención de la reacción   |
| V   | 2,5                                  | 60   | 4          | Incremento de producto secundario  |

<sup>a</sup> En todos los casos el solvente utilizado fue DCM; <sup>b</sup> Rendimiento obtenido al incrementar la superficie de contacto entre el oxidante y **4**.

De acuerdo a lo anterior se identificó que a medida que se incrementaron los moles iniciales del compuesto **4** (ensayos II y III, Tabla 19) aumentó el tiempo necesario y se detuvo el avance de la reacción, disminuyó el rendimiento y apareció un producto secundario. Una de las medidas

tomadas para mitigar los dos primeros efectos mencionados fue utilizar un recipiente de fondo ancho para realizar la reacción, con lo que se incrementó la superficie de contacto del compuesto 4 (en solución) con el oxidante en fase sólida. Al realizar esta acción usando las condiciones del ensayo III, se observó que el rendimiento de reacción mejoró hasta un 75%. Otra de las consecuencias de la cantidad inicial, como se comentó anteriormente, fue la aparición de un producto secundario que al ser aislado y analizado por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo C, p. 211), resultó ser un isómero de posición del compuesto 5 (isocroman-3-ona, Figura 48). Con el fin de disminuir la formación del producto secundario se varió la temperatura (ensayos IV y V), pero los resultados obtenidos no fueron los deseados, ya que a menor temperatura la reacción se detuvo y al aumentarla aumentó la formación del producto secundario. Considerando los resultados anteriores se escogieron las condiciones de reacción mostradas en el ensayo III.



**Figura 48.** Producto secundario (isocroman-3-ona) obtenido en la síntesis de isocroman-1-ona (5).

Considerando las metodologías de síntesis informadas para obtener el compuesto 7 y similares (Hoefgen y col., 2006; Lehmann y col., 2006; Mohr y col., 2006) se estudiaron diferentes condiciones de reacción en las que se modificó: el solvente, el catalizador y la fuente de radiación (Tabla 20). Ellas fueron evaluadas de forma cualitativa por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y en algunos casos por espectrometría de masas (Anexo B, p. 192-6) a su vez acompañada por espectroscopia cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detección por UV<sub>254</sub> y por ELSD (evaporative light scattering detector - detector evaporativo por dispersión de luz). En la CCF se utilizó una fase móvil de AcOEt:hexano 1:1 observándose razones de frente

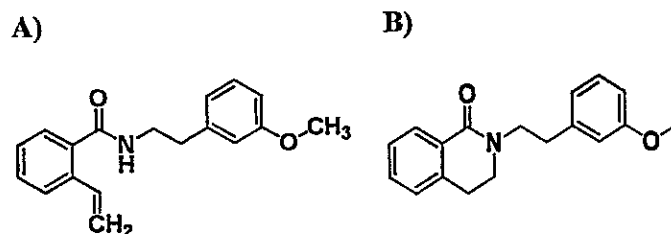
( $R_f$ ) de 0,63 y de 0,19 para los compuestos **5** y **7** respectivamente. En la espectrometría de masas el compuesto **7** se identificó por medio del ión molecular ( $M^+$ ) de relación  $m/z$  masa de 300. En el cromatograma con detección por UV<sub>254</sub> se observó el compuesto **5** en el minuto 1,21; el **6** en el minuto 0,88 y el **7** en el minuto 1,92. En cuanto a la detección por ELSD el compuesto **6** fue detectado alrededor del minuto 0,90 y el **7** alrededor del minuto 1,98 en las mismas condiciones cromatográficas. La **Tabla 20**, además de resumir las condiciones de reacción utilizadas, da cuenta de la presencia de compuestos secundarios mayoritarios detectados a través de sus iones moleculares.

**Tabla 20.** Resumen de las diferentes condiciones de reacción evaluadas para la obtención del compuesto **7**.

| N°              | Condiciones de reacción <sup>a</sup> |           |         |            | Resultados<br>$t_r$ (min)/ $M^+$ (g/mol) |
|-----------------|--------------------------------------|-----------|---------|------------|--|
|                 | Solvente/cat                         | Radiación | T °C    | Tiempo (h) |  |
| I               | Tolueno/pTsOH,                       |           | reflujo | 7          | 2,65/ 563                                |
| II              | Tolueno                              | $\mu$ W   | 180     | 1          | 2,65 / 563                               |
| III             | Tolueno/pTsOH                        | $\mu$ W   | 180     | 7          | 2,65 / 563                               |
| IV              | ---/EtOH ,                           |           | reflujo | 24         | 1,92 / 300                               |
| V               | ---/EtOH                             | $\mu$ W   | 160     | 2          | 1,93 / 300; 2,55 / 281                   |
| VI <sup>b</sup> | ---/EtOH                             | $\mu$ W   | 160     | 11         | 1,93 / 300; 2,53 / 281                   |
| VII             | ----                                 | $\mu$ W   | 150     | 1          | 1,92/ 300; 2,52/ 281                     |
| VIII            | ----                                 | $\mu$ W   | 200     | 0,5        | 1,90 / 300; 2,52/--; 3,05/--             |
| IX              | ----                                 | ---       | 80      | 168 (7d)   | ---- <sup>c</sup>                        |
| X               | ----                                 |           | 120     | 16         | ---- <sup>c</sup>                        |
| XI              | ----                                 |           | 120     | 24         | ---- <sup>c</sup>                        |

<sup>a</sup> Se utilizó una relación isocroman-1-ona y 3-metoxifeniletamina 1:1; <sup>b</sup> Se utilizó una relación isocroman-1-ona y 3-metoxifeniletamina 1:2; <sup>c</sup> Producto sólo observado por CCF usando como patrón el compuesto **7** aislado en el ensayo **IV**.

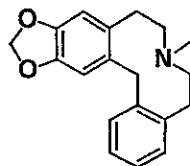
En la primera instancia que se desarrolló la síntesis de la amida **7** utilizando tolueno como solvente y 18 h de reacción, los autores obtuvieron un rendimiento del 68% (Hoefgen y col., 2006). Al intentar reproducir sus condiciones se realizaron los ensayos del **I** al **III** (Tabla 20), donde no se observó formación del compuesto **7**. Otra de las metodologías utilizadas por el mismo grupo para obtener moléculas similares a **7**, consistió en mezclar el compuesto **5** y el **6** (o similares) en ausencia de solvente manteniendo la mezcla por 5 h a 120 °C obteniendo rendimientos de entre 19% y 43% o por 7 días (168 h) a 80 °C obteniendo un rendimiento de 60% (Lehmann y col., 2006; Mohr y col., 2006). Considerando los bajos rendimientos y/o largos tiempos de reacción informados, se propusieron y se realizaron los ensayos del **IV** al **XI** (Tabla 20) observándose en todos los casos la formación del compuesto **7**. En el ensayo **IV** no se observó la presencia de productos secundarios, pero la reacción procedió con un rendimiento de sólo 38%. A partir del resultado anterior se propuso utilizar radiación de microondas (ensayos del **V** al **VIII**) con el fin de incrementar el rendimiento. En estos ensayos se observó que el compuesto **5** no reaccionaba completamente y un producto secundario se formaba en cantidades mayores al aumentar el tiempo de irradiación. Por espectrometría de masas se observó que el producto secundario poseía una masa molar de 281 g/mol, lo que apuntaría a la formación de un producto de deshidratación de la amida (Figura 49 A) o a la formación de una 3,4-dihidroisoquinolin-1-ona (Figura 49 B). En los ensayos **IX** y **X** la reacción se desarrolló en ausencia de solvente según lo descrito por los autores, obteniéndose rendimientos de 60% y 46% respectivamente, resultados similares a los informados en la literatura. El aumento del tiempo del ensayo **X** al doble (ensayo **XI**) superó lo experimentado e informado, obteniéndose un rendimiento de 87% del compuesto **7**.



**Figura 49.** Posibles estructuras del producto secundario de masa molar 281 g/mol observado en los ensayos V, VI y VII (Tabla 20) realizados para la formación de la amida 7.

Para obtener la amina bicíclica **8** se utilizó la metodología propuesta (Hoefgen y col., 2006; Mohr y col., 2006) en la cual se realizó inmediatamente la reducción de la imina formada en la reacción de la amida **7** con  $\text{POCl}_3$  sin realizar un procedimiento extenso de aislamiento y purificación. El rendimiento alcanzado en esta reacción fue de 65%, prácticamente igual al informado por los autores. La caracterización de **8** por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  mostró que la integración y el desplazamiento químico de los picos corresponde con lo informado (Hoefgen y col., 2006; Lehmann y col., 2006).

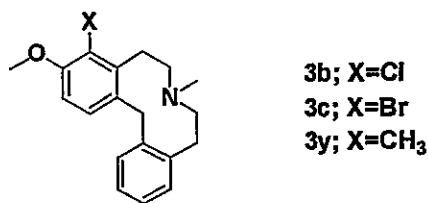
Los compuestos **9** y **3** se sintetizaron utilizando sin modificar una metodología propuesta para la obtención del compuesto representado en la **Figura 50** (Robaa y col., 2011). En ambas reacciones se obtuvieron buenos rendimientos (81% y 91% respectivamente), similares al informado en la referencia.



**Figura 50.** Compuesto sintetizado por Robaa y col., 2011.

### Síntesis de derivados de 3MOD modificados en el anillo A.

La modificación del anillo A de 3MOD, según la propuesta basada en los estudios de simulación, consta de la inclusión de halógenos o un grupo metilo en el C-4 con los cuales se evaluaría un potencial incremento de la afinidad debido a la hipotética formación de un puente de halógeno (Figura 51). Los resultados que se exponen a continuación dan cuenta en primera instancia de las metodologías probadas para la obtención de 4-CIMOD (3b) y 4-BrMOD (3c), compuestos sintetizados y evaluados bioquímicamente (en cuanto a su afinidad por los receptores dopaminérgicos:  $K_i$ ). En segunda instancia se muestran los resultados obtenidos en los intentos sintéticos infructuosos para obtener el derivado 4-MeMOD (3y).



**Figura 51.** Objetivo sintético: derivados de 3MOD modificados en el anillo A.

#### *Síntesis de 4-CIMOD (3b)*

La formación del derivado 3b fue seguida por medio de CCF y por espectrometría de masas identificando los compuestos obtenidos por medio de sus iones moleculares ( $M^+$ ) donde 3MOD presenta una razón  $m/z$  de 281 y 3b de 316 (Anexo B, p. 197-8). Para su obtención se probaron tres metodologías (Tabla 21) en las cuales se emplearon dos agente halogenantes: *N*-clorosuccimida (NCS) y cloruro de sulfurilo ( $SO_2Cl_2$ ). La utilización de  $SO_2Cl_2$  y de  $CH_3CO_2H$  como solvente (ensayo III, Tabla 21) dio como resultado la formación de un precipitado blanco

de fácil aislación, cuyo análisis espectrométrico mostró como único componente el compuesto **3b**, obtenido con un rendimiento de 46%. Utilizando las otras metodologías, la evaluación por medio de espectrometría de masas mostró un predominio del compuesto de partida.

**Tabla 21.** Condiciones de reacción evaluadas en la obtención de **3b**.

| Nº  | Condiciones de reacción         |                                   |        |            | $t_r$ (min) <sup>a</sup> / $M^+$ |
|-----|---------------------------------|-----------------------------------|--------|------------|----------------------------------|
|     | Agente halogenante              | Solvente                          | T (°C) | Tiempo (h) |                                  |
| I   | NCS                             | MeCN                              | 60     | 1h         | 3,37/282; 3,85/398; 4,42/---     |
| II  | NCS                             | TFA                               | 25     | 1h         | 3,25/282;677                     |
| III | SO <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H | 25     | 2h         | 5,63/316-318 <sup>b</sup>        |

<sup>a</sup> Anexo B:  $t_r$  = tiempo de retención obtenido del cromatograma con detección por UV<sub>254</sub>; <sup>b</sup> La CCF mostro resultados diferentes a los observados anteriormente, por lo que se procedió a la purificación del analito y a la obtención de sus espectros.

El análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H mostró en la zona de alta frecuencia un grupo de señales cuya integral conjunta indicaba la presencia de 6 protones, mostrando que la halogenación había ocurrido en las regiones aromáticas de la molécula. Se observó un acoplamiento entre dos dobletes con <sup>3</sup>J = 8.7 Hz, señales que fueron asignadas a los protones en C-1 y en C-2. Los resultados observados dan cuenta de que la cloración por medio de SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fue selectiva en C-4.

#### *Síntesis de 4-BrMOD (3c)*

La síntesis de **3c** se monitoreo por espectrometría de masa (Anexo B, p. 199-200), donde el  $M^+$  para el compuesto monohalogenado se identificó con la razón  $m/z$  de 360 y de 362 con intensidades relativas de 100 y 97,5% según las abundancias isotópicas del Br en la molécula. Para obtener el compuesto **3c** se probaron 4 metodologías en las que se empleó como agentes

halogenantes bromo molecular ( $\text{Br}_2$ ) y *N*-bromosuccimida (NBS). Con este último reactivo se varió además el solvente entre MeCN y TFA a modo de disminuir la cantidad de isómeros monobromados observados. La única reacción que mostró un producto monobromo mayoritario fue la que utilizó NBS y TFA como solvente (ensayo IV, **Tabla 22**). Una vez aislado este compuesto, que fue obtenido con un rendimiento de 36%, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (ver más adelante) mostró que la monobromación había ocurrido en el C-4. En la **Tabla 22** se muestran las condiciones de reacción evaluadas y los resultados resumidos observados por la espectrometría de masas.

**Tabla 22.** Condiciones de reacción evaluadas en la obtención de **3c**.

| N°  | Condiciones de reacción    |                                  |        | Resultados<br>$t_r$ (min) <sup>a</sup> / $M^+$                |
|-----|----------------------------|----------------------------------|--------|---|
|     | Agente halogenante         | Solvente                         | T (°C) |   |
| I   | $\text{Br}_2$ <sup>b</sup> | $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ | 25     | 1,28 / 360-362; 1,95/360; 2,28/---                            |
| II  | NBS                        | MeCN                             | 25     | 3,10/ 282 ; 3,57/ 410   |
| III | NBS                        | MeCN                             | 60     | 3,42/ 282; 3,68/ 330  |
| IV  | NBS                        | TFA                              | 25     | 3,25/ 360-362; 3,49/ 360-362; 3,75/ 360-362;<br>4,22 /360-362 |

<sup>a</sup> Anexo B:  $t_r$  = tiempo de retención obtenido del cromatograma con detección por  $\text{UV}_{254}$ ; <sup>b</sup> Solución 0,2 M en DCM; <sup>c</sup> CCF diferente a los observados anteriormente, por lo que se procedió a la purificación del analito y obtención de sus espectros.

Las condiciones mostradas en la **Tabla 22** dan cuenta de que la bromación ocurre preferentemente al utilizar ambos agentes halogenantes en presencia en solventes polares próticos. Además, al observar la intensidad de las señales dadas por el detector ELSD (Anexo B, p. 200), se concluye que la bromación presenta mayor selectividad en el ensayo IV, observándose un compuesto mayoritario en el minuto 3,31.



Una vez aislado el compuesto se le realizaron los mismos análisis espectrométricos que para el derivado **3b** observándose similares resultados. En este caso la constante de acoplamiento entre los protones en C-1 y C-2 fue de 8,6 Hz, lo que confirma la monobromación en C-4.

Los resultados anteriores dan cuenta de que si bien las condiciones de reacción NBS/TFA no son muy selectivas, permitieron aislar el compuesto mayoritario de bromación de 3MOD que correspondió a la monobromación en el C-4.

#### *Intentos de síntesis de 4-MeMOD (3y)*

Las reacciones orientadas a la síntesis del derivado **3y**, al igual que para los otros derivados, se monitorearon por espectrometría de masas (Anexo B, p. 201-8), donde se busco la señal a  $m/z$  296. Todas las metodologías evaluadas (a una escala de 0,02 mmol de **3c**) se basaron en la reacción de alquilación por acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura (Miyaura y Suzuki, 1979) que utiliza como precursor un derivado halogenado (bromado o yodado de preferencia) y como fuente del grupo alquilo un ácido borónico. Además la síntesis se desarrolla en presencia de una base y utiliza un catalizador de paladio. En la **Figura 52** se ejemplifica la reacción de Suzuki con la transformación deseada de **3c** a **3y**. Las modificaciones principales a las condiciones de reacción originales estuvieron dadas por: la base, el solvente y el catalizador de paladio.

Para obtener el compuesto **3y** se ensayaron 10 metodologías sintéticas (**Tabla 23**). En todos los casos el compuesto de partida permaneció de forma mayoritaria inalterado y solo al utilizar  $K_2CO_3$  como base,  $Pd[(P(Ph)_3)_4]$  como catalizador y tolueno como solvente (ensayo I, **Tabla 23**) se observó una mayor presencia de **3y** con respecto a las otras sustancias. Considerando que las condiciones evaluadas no fueron exitosas y solo se trabajó a pequeña escala no se aisló el compuesto **3y**.

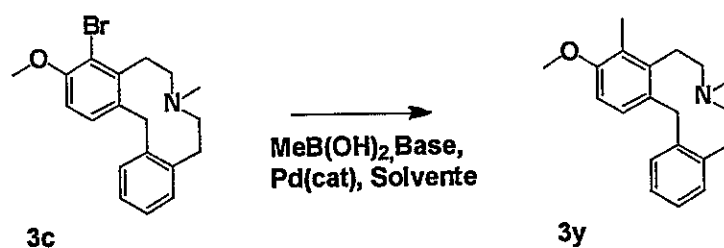


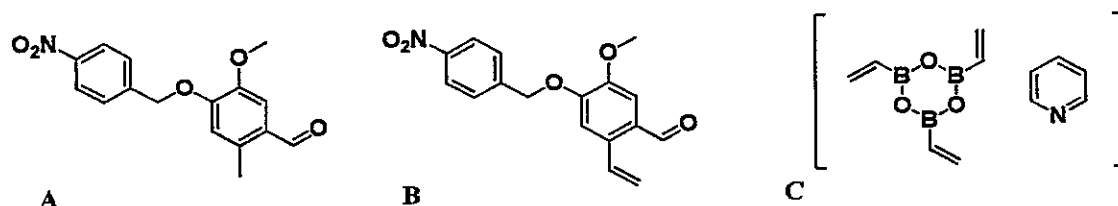
Figura 52. Esquema de la reacción de Suzuki para la transformación del compuesto 3c a 3y.

Tabla 23. Condiciones de reacción evaluadas para la obtención de 3y.

| N°              | Condiciones de reacción <sup>a</sup>       |            |                                | Resultados<br>t <sub>r</sub> (min) /M <sup>+</sup> |
|-----------------|--|------------|--------------------------------|--|
|                 | Solvente/T                                 | Tiempo (h) | Base                           |  |
| I               | Tolueno/reflujo                            | 9          | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 5,32/---; 6,19/362; 6,88/296;<br>8,55/278,9        |
|                 |  | 24         |                                |  |
|                 |  | 48         |                                |  |
|                 |  | 72         |                                |  |
| II              | Tolueno, μW/180 °C                         | 3          | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 4,69/362; 5,17/296; 6,55/278                       |
| III             | Benceno, reflujo                           | 8          | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 7,10/362   |
| IV              | Benceno, reflujo                           | 8          | K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 6,15/362; 6,94/296; 8,5/278                        |
|                 |  | 24         |                                |  |
| V               | Benceno, reflujo                           | 8          | NaOH                           | 5,78/362; 6,73/296; 8,47/278                       |
|                 |  | 24         |                                |  |
| VI              | DME  | 8          | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 6,17/362; 6,93/296; 8,55/278                       |
|                 |  | 24         |                                |  |
| VII             | DMF  | 8          | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 6,51/348; 7,16/362                                 |
| VIII            | Benceno, reflujo                           | 8          | NaOMe                          | 6,55/362; 7,24/---; 8,57/278                       |
| IX <sup>b</sup> | Dioxano:H <sub>2</sub> O (5:1) /<br>100 °C | 6          | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 2,79/362   |
| X <sup>c</sup>  | MeOH, 60 °C                                | 8          | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 6,25/282; 6,48/362; 7,14/314                       |

<sup>a</sup> En todos los casos se utilizaron 0,02 mmol de Ar-Br, 0,06 mmol de MeB(OH)<sub>2</sub> y 0,1 mol % de Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] como catalizador; <sup>b</sup> Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] como catalizador; <sup>c</sup> Pd(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como catalizador.

Las reacciones del tipo Suzuki-Miyaura se utilizan ampliamente para introducir grupos alquilo, alilo y aromáticos con rendimientos superiores al 50% y en un tiempo menor a 24 h en la mayoría de los casos (Paunescu y col., 2007; Reid y col., 2011; Porcù y col., 2014). En particular la inclusión de un grupo metilo empleando las condiciones clásicas, similares a las utilizadas en este trabajo (Tabla 23), difiere en comparación con otros grupos, observándose una disminución del rendimiento y un aumento de los tiempos de reacción. Takaya y colaboradores desarrollaron la síntesis de los compuestos **A** y **B** (Figura 53) utilizando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  como base,  $\text{Pd}[(\text{P}(\text{Ph})_3)_4]$  como catalizador y dimetiléter (DME) como solvente (similar al ensayo VII, Tabla 23). Para la síntesis de **A** se utilizaron: 4 eq. de  $\text{MeB}(\text{OH})_2$ , 0,1 eq. de catalizador y 42 h de reacción, obteniéndose un rendimiento de 34%. En cambio, para la síntesis de **B** se utilizaron 2 eq. del complejo de trivinil boroxina piridina (Figura 53 C), 0,05 eq. de catalizador y 7 h de reacción, obteniéndose un rendimiento de 89% (Takaya y col., 2011). Además la reacción de Suzuki en el C-4 de 3MOD presenta menor posibilidad de ocurrencia por el efecto electrón-donor del grupo metoxilo ubicado en posición *orto* con respecto a C-4. Si bien otros autores han realizado la metilación por medio de la reacción de Suzuki en anillos medianamente activados, utilizando  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  como base,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  como catalizador y una mezcla 1,4-dioxano: $\text{H}_2\text{O}$  (4:1) como solvente, obteniendo sobre un rendimiento de reacción sobre el 50% (Sipos y col., 2008), esta metodología no fue evaluada en el sistema en estudio.

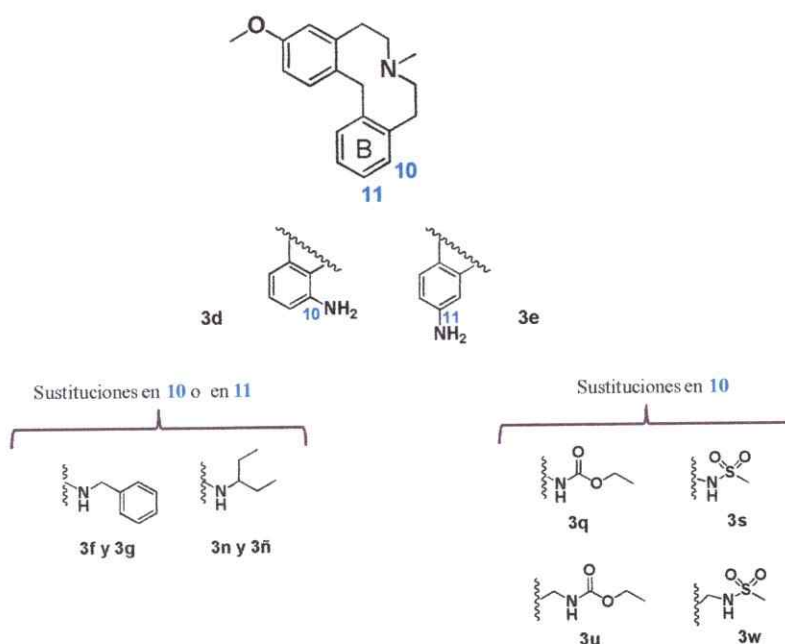


**Figura 53.** Compuestos **A** y **B** sintetizados previamente (Takaya y col., 2011). En azul se destaca el grupo introducido. A la derecha de la figura, enmarcado, el complejo de trivinil boroxina y piridina.

Las condiciones de reacción evaluadas dan cuenta finalmente de que la metilación de un anillo aromático medianamente activado por reacción de Suzuki es compleja y que la conversión del derivado bromado, al menos en los tiempos evaluados, es siempre incompleta.

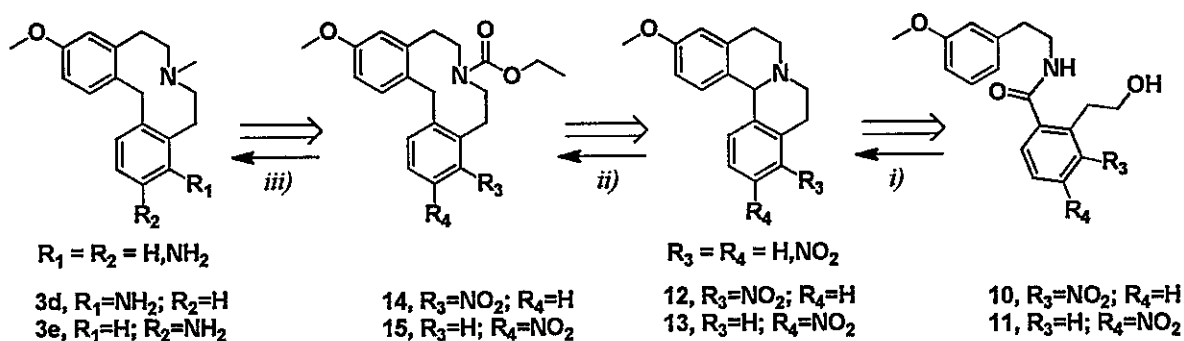
### **Síntesis de derivados de 3MOD en el anillo B.**

Para realizar la síntesis de derivados de 3MOD con modificaciones en el anillo B se propone que en análogos de la amida 7 (**Figura 47**) ya estén presentes los sustituyentes, o por lo menos la amida se encuentre funcionalizada con algún grupo modificable en una o dos etapas de síntesis que no interfieran con el resto de la molécula. Considerando lo anterior y los resultados de acoplamiento molecular resumidos en la **Figura 54**, se propuso que un derivado de 3MOD que posea un grupo funcional de tipo amino en el anillo B podría entregar la versatilidad requerida para obtener derivados que potencialmente mejoren su afinidad en los RDs y/o su selectividad tanto por receptores hD<sub>1</sub> como hD<sub>2</sub>.



**Figura 54.** Precursores **3d** y **3e** propuestos que satisfacen la versatilidad requerida para obtener los derivados **3f**, **3g**, **3n**, **3ñ**, **3q**, **3s**, **3u** y **3w**. En azul el número de la posición a sustituir.

Para obtener tanto el derivado **3d** como el **3e** se puede tomar como punto de partida un derivado nitrado en la posición deseada y luego, a partir de este, obtener el grupo amino por reducción (Carstens y col., 2013). Un grupo nitro, si bien se propone utilizar como una fuente del grupo amino, además puede actuar como protector del precursor, ya que el anillo nitrado no reaccionaría en la ciclación en la que se utiliza  $\text{POCl}_3$  como promotor, ni en la posterior reacción de apertura del ciclo mediante el empleo de cloroformiato de etilo (De Luca y col., 2006). Entonces, obtener la amida **10** u **11** podría ayudar directamente a la reducción del número de pasos sintéticos al tener presente un grupo nitro en el anillo B. En la **Figura 55** se encuentra el esquema de la retrosíntesis y síntesis comentada anteriormente.



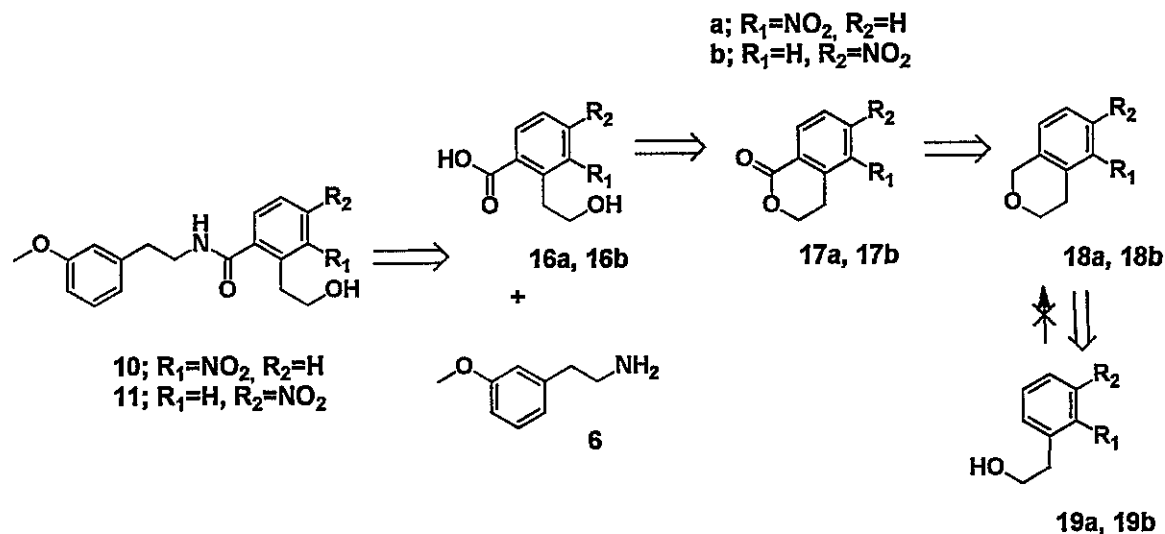
**Figura 55.** Retrosíntesis desde el derivado aminado en el anillo B de 3MOD hasta la amida precursora del compuesto tetracíclico. Síntesis de **3d** y **3e** desde **10** y **11** respectivamente: *i)* 1-  $POCl_3$ ,  $120\text{ }^\circ\text{C}$ ; 2- MeOH,  $NaBH_4$ , reflujo, 0,5 h; *ii)* 1-  $ClCO_2Et$ ,  $THF_{(seco)}$ ,  $-65\text{ }^\circ\text{C}$ , 4 h; 2-  $NaCNBH_3$ , THF,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ; *iii)* 1-  $H_2$ , Pd/C, EtOH; 2-  $LiAlH_4$ , THF,  $25\text{ }^\circ\text{C}$

*Síntesis de la amida 10 y 11. Obtención de sus precursores.*

La retrosíntesis de las amidas **10** y **11** (Figura 56) muestra que el sintón lógico formado al romper el enlace CO-NH, es el ácido benzoico **16** (sustituido en *orto* con un grupo  $-CH_2CH_2OH$  y en *para* con un grupo nitro). Este compuesto presenta la problemática sensibilidad de la función alcohólica a las condiciones de formación de amidas, ya que podría participar en una reacción de esterificación conducente a un polímero (Smith, 2001). Para evitar lo anterior se propuso realizar la síntesis de **10** y **11** con el grupo alcohólico en **16** protegido. De acuerdo a lo informado para la síntesis de 5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecinas (Mohr y col., 2006; Enzensperger y col., 2007), el grupo lactónico en la isocromanona cumple esta función, por lo cual partir con una molécula de este tipo funcionalizada en el C-3 o en el C-4 con un grupo nitro cumple los requisitos descritos previamente.

La síntesis de compuestos del tipo isocromanona ha sido informada con sustituyentes electrón-donores como el grupo metoxilo y se desarrolla por medio de dos pasos sintéticos (Cutler y col.,

1997; Quallich y col., 1998). El primero de ellos, crucial ya que da paso a la formación del biciclo, se realiza por medio de una sustitución aromática electrofílica ( $S_{Ar}E$ ). En el caso de la propuesta la presencia de un grupo nitro desactivante disminuye la probabilidad que se efectúe la reacción.



**Figura 56.** Primera opción retrosintética. Obtención de amida 10 y 11.

Considerando lo anterior se propuso, una segunda opción retrosintética desde el compuesto 11 (Figura 57), donde se reemplaza el grupo alcohólico de 16 con un éster carboxílico. Este puede ser reducido selectivamente a alcohol por  $LiBH_4$  en THF a temperatura ambiente, sin afectar los grupos amida y nitro (Boyle y col., 2011). Para obtener 21 sin tener problemas con la función ácida vecina se propuso su obtención a partir de la descarboxilación de 22 (Krapcho y col., 1978). Donde, el grupo malonato se puede insertar en la función aromática a través de una sustitución aromática nucleofílica ( $S_{Ar}N$ ). El compuesto 23 se propuso como compuesto de partida, ya que se ha utilizado en  $S_{Ar}N$  malónica (Quallich y col., 1998) y existe en el comercio.

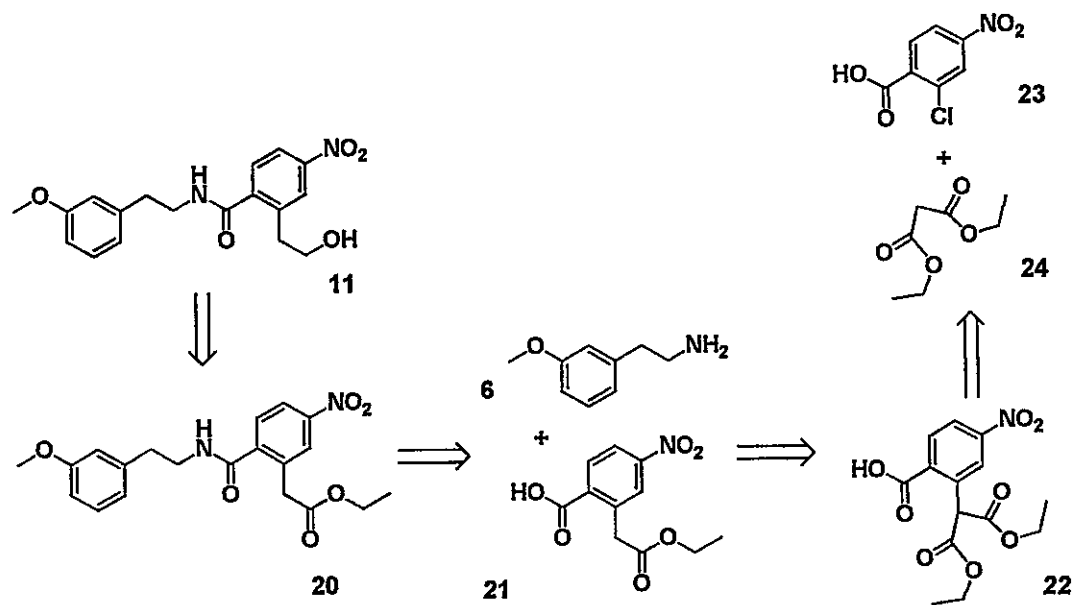


Figura 57. Segunda opción retrosintética. Obtención de la amida 11.

Por lo tanto la síntesis del derivado 11, según lo planteado, involucra cuatro pasos detallados en la Figura 58.

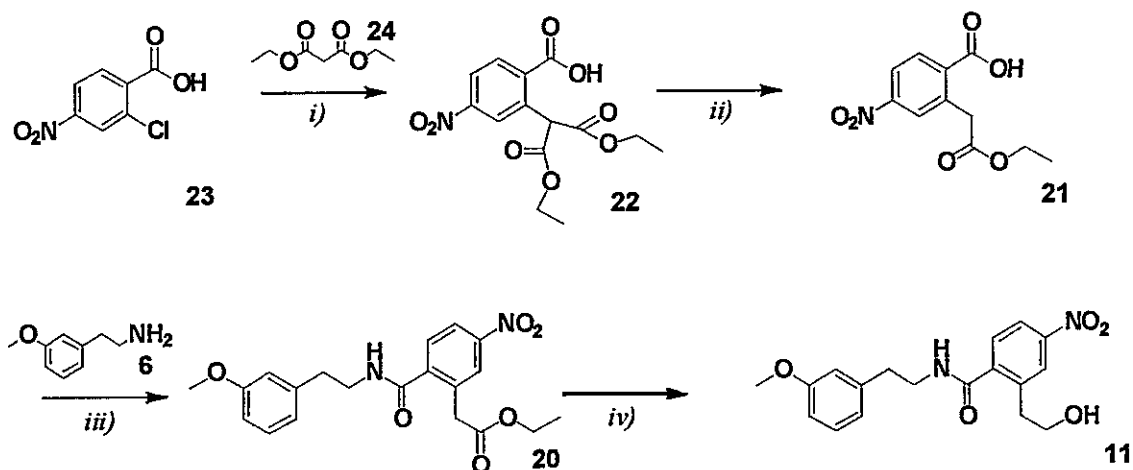


Figura 58. Síntesis propuesta para la formación de 11. *i)* CuBr, 70 °C, NaOMe, 24 h; *ii)* LiCl, DMSO/H<sub>2</sub>O(1%), *iii)* 1-. CDI, THF, 25 °C; 2-. amina 6, THF, 25 °C, 16 h; *iv)* LiBH<sub>4</sub>, THF, 25 °C.



Para formar la amida **10** se propuso seguir la misma metodología expuesta anteriormente, pero el costo comercial del compuesto homólogo de **23** para formar **10** (Figura 59) es 30 veces mayor desde la fuente comercial más económica utilizada (AK Scientific, Inc.). Por esto la metodología representada (Figura 58) se probó inicialmente para la obtención de **11**.

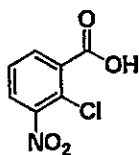


Figura 59. Homólogo de **23** (ácido 2-cloro-3-nitrobenzoico) propuesto para formar la amida **10**.

#### *Formación del ácido 2-(1,3-dietoxi-1,3-dioxopropan-2-il)-4-nitrobenzoico (22)*

Para la síntesis de **22** existen varios artículos y patentes que describen las condiciones de reacción según la propuesta comentada (paso *i*), Figura 58). En estos artículos se informa que la reacción tiene un rendimiento superior al 90% y que el producto es fácilmente purificable. En esta purificación se debe filtrar el precipitado formado y retirar por lavado el exceso de malonato de dimetilo que no reacciona, ya que este a su vez es utilizado como solvente. Las variantes principales introducidas en el presente trabajo fueron: temperatura (70 o 100 °C), la utilización del ácido cloronitrobenzoico en vez del bromonitrobenzoico y la utilización de malonato de dietilo en vez de malonato de dimetilo (Bruggink y McKillop, 1975; Quallich y col., 1998; Akkiralá, 2007).

A partir de lo anterior se intentó la síntesis y se analizó el precipitado formado por medio de RMN <sup>1</sup>H, observándose solo el compuesto de partida. El resultado negativo motivó la búsqueda de variantes de las condiciones ensayadas, como también de nuevas propuestas. Así se modificaron: la temperatura, la base, la estequiometría: del catalizador y del malonato, el catalizador, y finalmente el solvente. El avance de la reacción fue seguido por cromatografía en

capa fina (CCF) utilizando co-cromatografía. Todas las metodologías evaluadas se detallan en la

**Tabla 24.**

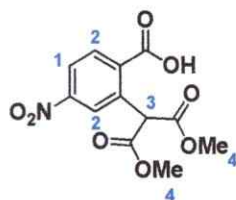
**Tabla 24.** Metodologías probadas para la síntesis de **22**.

| N°                | Condiciones de reacción <sup>a</sup> |                                      |             |                    |                  |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------|------------------|
|                   | eq. de malonato de metilo            | Base (eq.)                           | Cat. (eq.)  | Solvente o soporte | Temp. (°C)       |
| I                 | 20                                   | NaOMe (2,5)                          | CuBr (0,08) | --                 | 70               |
| II <sup>1</sup>   | 20                                   | NaOMe (2,5)                          | CuBr (0,08) | --                 | 100              |
| III               | 1                                    | NaOMe (2,5)                          | CuBr (0,08) | --                 | 100              |
| IV <sup>2</sup>   | 20                                   | NaH (2,5)                            | CuBr (0,06) | --                 | 80               |
| V                 | 20                                   | NaH (2,5)                            | CuBr (0,5)  | --                 | 80               |
| VI                | 1                                    | NaOMe                                | CuBr (0,1)  | MeCN               | reflujo          |
| VII <sup>3</sup>  | 1,1                                  | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3)   | TEBA (0,1)  | Alúmina            | MW-100 °C(5min)  |
| VIII <sup>4</sup> | 1,1                                  | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3)   | TEBA (0,1)  | Alúmina            | MW-100 °C(10min) |
| IX                | 1                                    | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,5) | CuI (0,05)  | DMF                | 100              |
| X                 | 1                                    | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,5) | CuI (0,05)  | DMF                | ambiente         |

<sup>a</sup> equivalentes (eq.) con respecto al ácido 2-cloronitrobenzoico (**20**); <sup>1</sup>(Bruggink y McKillop, 1975; Quallich y col., 1998); <sup>2</sup>(Bruggink y McKillop, 1975); <sup>3</sup>(Akkirala, 2007); <sup>4</sup>(T. Liu y col., 2012)

De las metodologías expuestas en la **Tabla 24**, desde el ensayo **I** al **VI** no se observaron cambios por CCF. La metodología **VII** había sido informada para sustituir un átomo de flúor o cloro, en un nitrobenzono, por un malonato o un derivado de este con un rendimiento sobre el 90% y en un tiempo de reacción menor a 5 minutos. Si bien para el compuesto **22** no se encontraba reportada la reacción, fueron probadas las mismas condiciones. Las pruebas realizadas mostraron que el material de partida no era consumido, incluso aumentando el tiempo al doble (**VIII**).

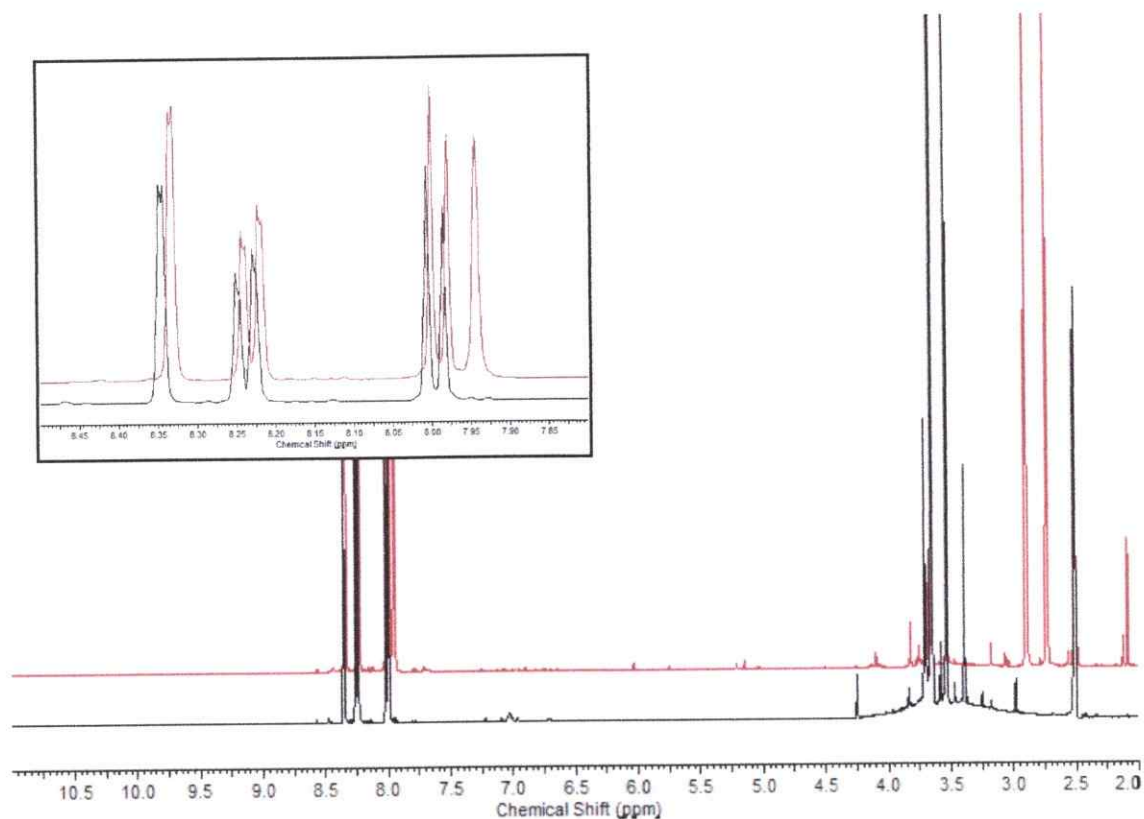
La inclusión de DMF como solvente (ensayos **IX** y **X**) responde a la alta insolubilidad del carboxilato formado al agregar la base. Cuando la reacción se efectuó a 100°C se observó la aparición de una multitud de manchas por CCF. De acuerdo a esto se disminuyó la temperatura, llegando hasta temperatura ambiente, obteniéndose así solo un compuesto que por CCF presentó una razón de frente levemente diferente a la del compuesto de partida. Este compuesto fue aislado para ser evaluado por RMN <sup>1</sup>H y su espectro, registrado en DMSO-*d*<sub>6</sub>, fue comparado con el del compuesto de partida (**Figura 60**). En la **Tabla 25** se informa los desplazamientos químicos, integraciones y acoplamientos del compuesto **22** publicados en las diferentes referencias utilizadas y en la **Figura 60** se muestra la asignación de las señales.



**Figura 60.** Asignación de señales de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **22**.

**Tabla 25.** Interpretación informada del espectro de RMN <sup>1</sup>H en DMSO-*d*<sub>6</sub> para el compuesto **22**.(Quallich y col., 1998; Akkiralala, 2007)

| Nº señal | δ (ppm) | Integral | multiplicidad | J(Hz) |
|----------|---------|----------|---------------|-------|
| <b>1</b> | 8,37    | 1        | d             | 2     |
| <b>2</b> | 8,30    | 2        | d             | 1     |
| <b>3</b> | 5,82    | 1        | s             | --    |
| <b>4</b> | 3,83    | 6        | s             | --    |



**Figura 61.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto obtenido de la reacción **III** (línea negra) y del compuesto aislado en la reacción **X** (línea roja).

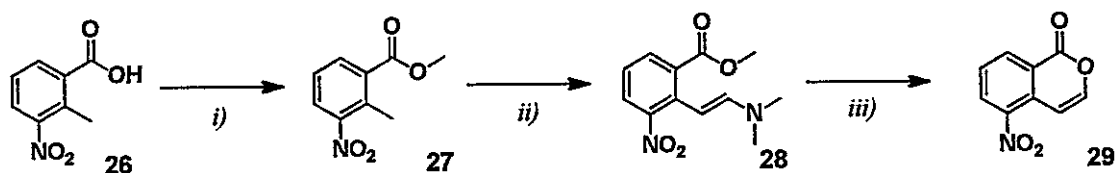
El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto aislado de la reacción **X** es diferente al del compuesto inicial, ya que aparece otra señal en la zona aromática con una integral correspondiente a un protón y aparecen dos señales en la zona de baja frecuencia donde cada una de ellas corresponde a 3 protones. Lamentablemente las señales observadas en este espectro no concuerdan con lo informado para el compuesto **22** (Tabla 25, Figura 60) (Quallich y col., 1998; Akkiral, 2007). Por lo tanto esta reacción, si bien inicialmente muestra diferencias a las anteriores, no generó el compuesto deseado.

El cobre posee la capacidad de formar complejos con DMF (Stålhandske y col., 2001) y el anión carboxilato (Sevryugina y col., 2007), ambos presentes en el medio de reacción. Es posible que

se haya formado un complejo de cobre con estos ligandos y que este haya sido aislado. El desconocimiento de esta posibilidad al momento de desarrollar la síntesis y la caracterización del compuesto aislado llevó a realizar el experimento de RMN  $^1\text{H}$  en DMSO, solvente que también es capaz de formar complejos con el cobre (Suarez y col., 1973). Lo anterior pudo producir un intercambio de ligandos del complejo con el solvente del experimento, lo que explicaría la observación en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de un equivalente molar del compuesto **23** y uno de DMF sin mayor modificación de sus desplazamientos químicos.

*Reformulación de la propuesta sintética para la obtención de precursores de las amidas **10** y **11**.*

A partir del resultado no deseado de las reacciones evaluadas para formar el compuesto **19**, se propuso una ruta alternativa para obtener la amida **10** y **11**, que considera como primer objetivo la síntesis de nitroisocumarinas (**Figura 62**) que presentan alta similitud con los compuestos **17a** y **17b** (**Figura 57**). La síntesis de la 5-nitroisocumarina (**29**) ha sido informada como producto secundario en la síntesis de indoles (Somei y col., 1981; Matsui y col., 1992). De acuerdo a lo informado, la obtención de **29** ocurre en tres pasos sintéticos partiendo del 2-metil-3-nitrobenzoato de metilo (**27**) obtenido del compuesto comercial ácido 2-metil-3-nitrobenzoico (**26**).

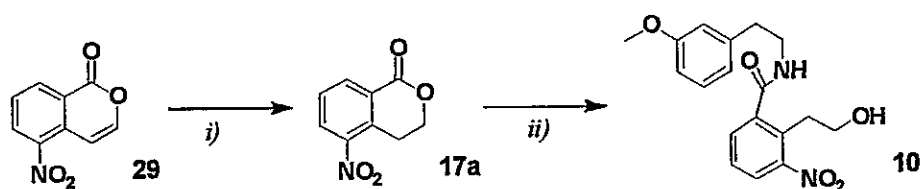


**Figura 62.** Síntesis de 5-nitroisocumarina (**29**). *i)* MeOH,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (cat), reflujo, 24 h; *ii)* DMFDMA, DMF, reflujo; *iii)*  $\text{SiO}_2$ , AcOEt, 2 h.

Los dos primeros pasos de la metodología sintética de la **Figura 62** han sido informados desde el

isómero de **26**, ácido 2-metil-4-nitrobenzoico, con un buen rendimiento. (Antoine y col., 2008; Zhang y col., 2013). Para el último paso sintético, si bien no había sido informado, no se visualizaban dificultades para su desarrollo.

A partir de **29** se propuso realizar una reducción selectiva del doble enlace utilizando  $\text{NaBH}_4$ . Si se ha de realizar una reducción total de **19**, se deben agregar pasos sintéticos de protección del grupo amino presente. Entre estos grupos el más apto sería el bencilo, pero la debilidad frente a formiatos descarta su utilización (Cooley y Evain, 1989; Greene y Wuts, 1991). La síntesis propuesta se encuentra en la **Figura 63**.



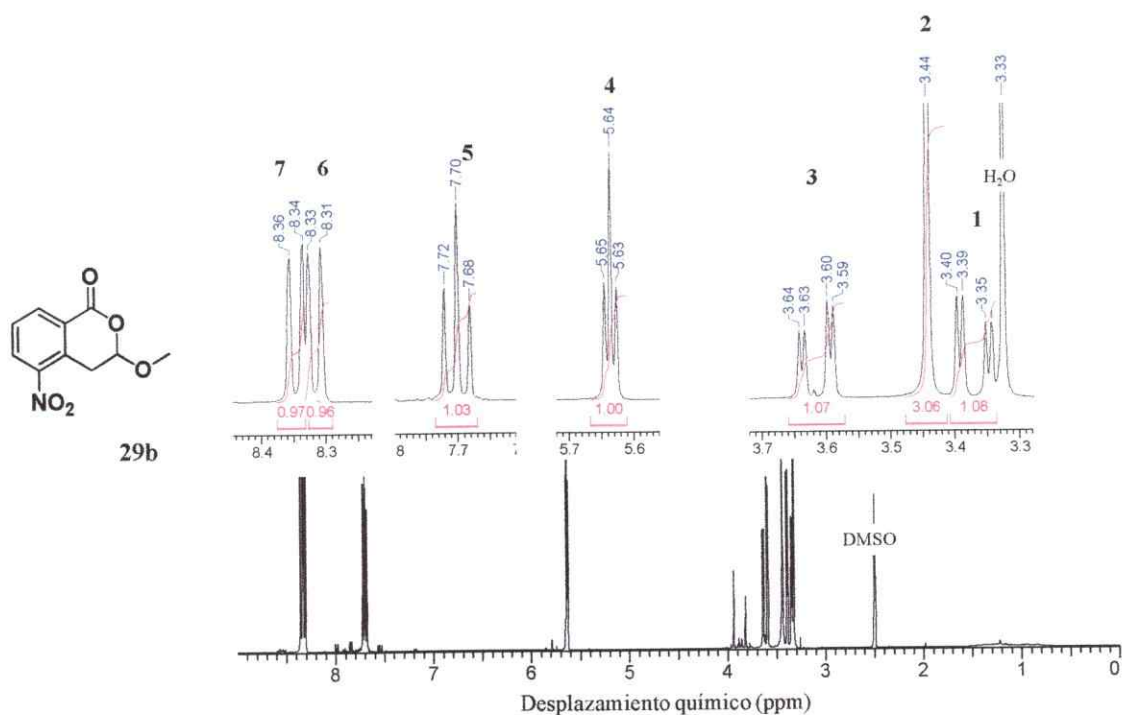
**Figura 63.** Propuesta síntesis de la amida **10** a partir de la nitroisocumarina **29**. *i)* MeOH,  $\text{NaBH}_4$ , 25 °C; *ii)* amina **6**, 120 °C.

#### *Formación de 5-nitroisocumarina (29)*

El primer paso para obtener **29** consistió en realizar la esterificación del ácido **26** con metanol. Para ello se utilizó metanol como solvente y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado como catalizador, obteniéndose **27** con un rendimiento de 90%. El segundo paso sintético, obtención de **28**, se realizó según lo informado, introduciendo modificaciones en la purificación con el fin de obtener una buena caracterización por RMN  $^1\text{H}$ . Para ello se realizó una destilación a presión reducida (a 260 °C y 8 Torr) obteniéndose un aceite rojizo oscuro con un rendimiento de 75%. La ciclación para obtener **29** se realizó sobre gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) utilizando AcOEt como solvente para dispersar el

compuesto en el medio. La agitación vigorosa del medio fue importante para aumentar el rendimiento. El rendimiento de **29** desde **27** fue de 23% realizando la purificación del intermediario **28**. Evitando este paso se observó un aumento del rendimiento de **29** hasta un 48%.

Una vez obtenido el compuesto **29** se intentó la reducción selectiva del doble enlace presente en el anillo de pirano. Para ello se propuso utilizar  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor y MeOH como solvente. Cuando se realizó la reducción se observó inmediatamente la formación de un producto secundario (**29b**) que presentaba la misma  $R_f$  de una de las impurezas observadas en la purificación de **29**. La caracterización por medio de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **29b** mostró que este era 3,4-dihidro-3-metoxi-5-nitrocumarina (estructura y espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **29b** en **Figura 63**, asignación de las señales en **Tabla 26**), compuesto que había sido informado como producto secundario en la síntesis de **29** desde **27** y producido desde **29** cuando se lo hacía reaccionar con MeOH, ácido clorhídrico concentrado y a la temperatura de reflujo (Somei y col., 1981). La reducción del compuesto **29b**, generó además otros dos compuestos que fueron aislados con bajos rendimientos. Los análisis espectrométricos mostraron en ambos la ausencia del doble enlace del anillo de pirano más otras señales que no correspondían en ninguno de los casos a las señales esperadas (Anexo C, p. 216-7). Lamentablemente la complejidad de ambos espectros hizo imposible la resolución estructural de estas moléculas, para lo cual se deben efectuar otros experimentos.



**Figura 64.** A la derecha de la figura el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **29b** y la ampliación de sus señales. Los números negros y en negrita corresponden a los números de las señales que se detallan en la **Tabla 26**. Los azules dan cuenta de los desplazamientos químico y los rojos las integrales de cada señal. A la izquierda de la figura se muestra la estructura de **29b**.

**Tabla 26.** Asignación de señales del espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto **29b**.

| N <sup>o</sup> señal | $\delta$ $^1\text{H}$ / ppm | Integ. | Mult. | Const. Acopl.           | Clasificación         |
|----------------------|-----------------------------|--------|-------|-------------------------|-----------------------|
| <b>1</b>             | 3,37                        | 1      | dd    | $J_1=17,6$<br>$J_2=3,7$ | Ar-CH <sub>2</sub> -  |
| <b>2</b>             | 3,44                        | 3      | s     |                         | O-CH <sub>3</sub>     |
| <b>3</b>             | 3,62                        | 1      | dd    | $J_1=17,6$<br>$J_2=3,7$ | Ar-CH <sub>2</sub> -  |
| <b>4</b>             | 5,64                        | 1      | t     | $J=3,7$                 | OCH <sub>3</sub> -CH< |
| <b>5</b>             | 7,70                        | 1      | m     |                         | Ar-H                  |
| <b>6</b>             | 8,32                        | 1      | d     | $J=7,8$                 | Ar-H                  |
| <b>7</b>             | 8,35                        | 1      | d     | $J=8,3$                 | Ar-H                  |



Para abordar el resultado negativo de la reducción de **29**, se propuso saltar el paso sintético respectivo y formar un intermediario de tipo isoquinolínico similar a **10** (Figura 65). La metodología propuesta se basó en dos trabajos en los que se reemplazaba el oxígeno del pirano por un nitrógeno proveniente de una amina primaria o secundaria, utilizando MeOH como solvente (Somei y col., 1981; Asano y col., 2008).

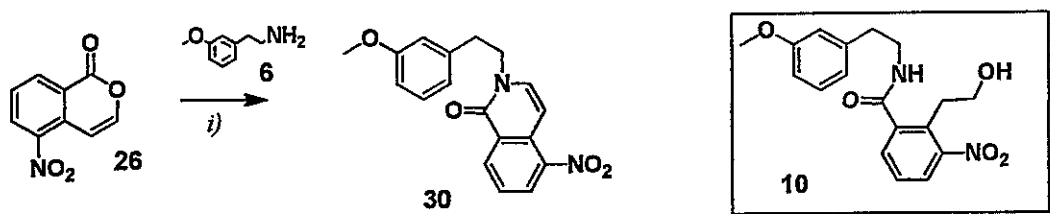


Figura 65. Reformulación de la síntesis. Obtención de amida **30** similar a la amida **10**.

Las pruebas mostraron que la utilización de MeOH como solvente producía **30** con un rendimiento de 30%, pero que en ausencia del solvente aumentaba el rendimiento de la reacción hasta un 83%. Además se evaluó la formación de **30** desde una mezcla de **29** y **29b** en una razón de 1:2 obtenida desde la purificación de **29**, obteniéndose el mismo elevado rendimiento de reacción.

#### Formación de 10-amino3MOD (**3d**)

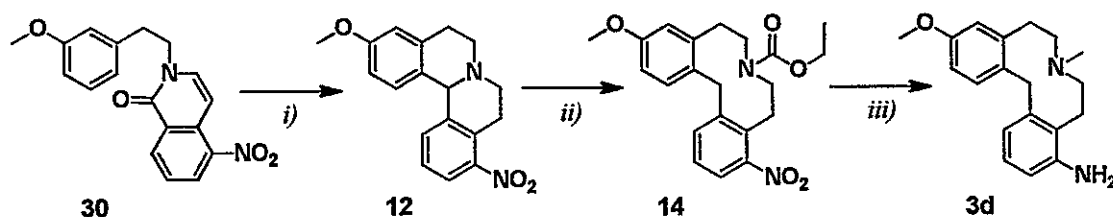
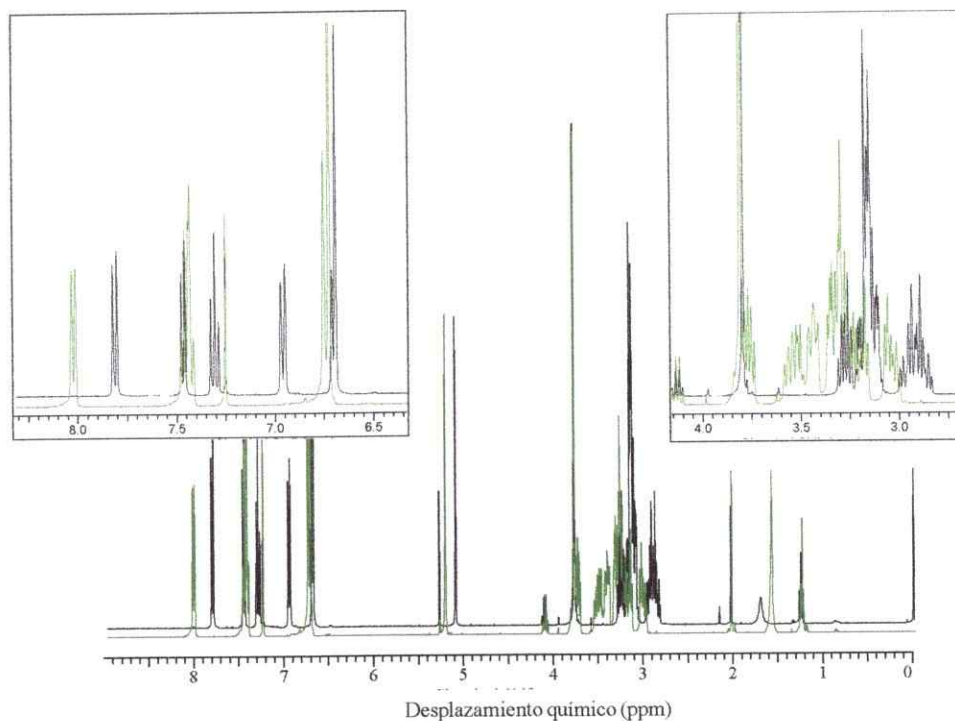


Figura 66. Síntesis de **3d** desde **30**: *i)* 1-. POCl<sub>3</sub>, 120 °C; 2-. MeOH, NaBH<sub>4</sub>, reflujo, 0,5 h; *ii)* 1-. ClCO<sub>2</sub>Et, THF<sub>(seco)</sub>, -65 °C, 4 h; 2-. NaCNBH<sub>3</sub>, THF, 25 °C; *iii)* 1-. H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH; 2-. LiAlH<sub>4</sub>, THF, 25 °C

De acuerdo a los resultados anteriores no se logró la síntesis de la amida **10**, sino que en su lugar se obtuvo el derivado **30**, el cual se utilizó en la obtención de la amina **3d**. Para ello se propuso utilizar la metodología sintética propuesta en la **Figura 66** (previamente mostrada en **Figura 55**), modificando principalmente la estequiometría de  $\text{NaBH}_4$  posterior a la reacción de ciclación de Bischler-Napieralski, dada la presencia de un doble enlace extra, antes ausente. A partir de las condiciones comentadas el compuesto **12** se obtuvo con un rendimiento de 31%.

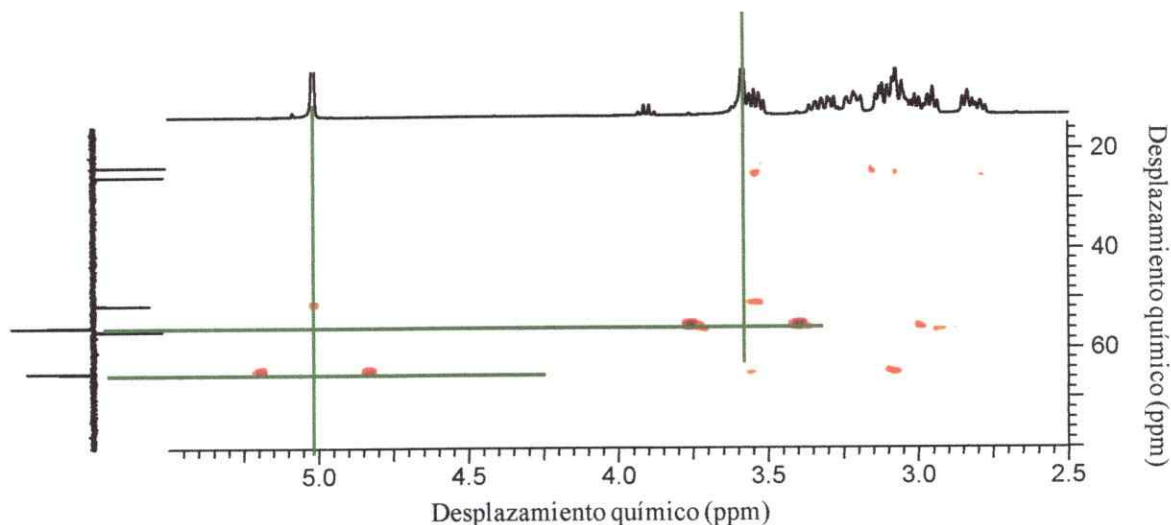
El siguiente paso correspondió a la formación de **14**. Para ello, se hizo reaccionar 1,85 g de **12**, disuelto en THF seco, a  $-65\text{ }^\circ\text{C}$ , en atmósfera inerte, con cloroformiato de etilo ( $\text{ClCO}_2\text{Et}$ ). Una vez transcurridas 4 h de reacción, a la misma temperatura, se agregó un exceso de cianoborohidruro de sodio ( $\text{NaCNBH}_3$ ) disuelto en THF. Luego se dejó que la mezcla reaccionante alcanzara lentamente la temperatura ambiente y se dejó por 16 h más. Una vez transcurrido este tiempo se finalizó la reacción agregando una solución 2 M de NaOH. Posteriormente se realizó una purificación por medio de cromatografía en columna "flash", utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo hexano 1:1, obteniéndose 1,8 g de un aceite.

La caracterización por medio de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto obtenido, mostró el mismo número de protones que los del compuesto de partida. La ausencia del grupo etilo en la molécula sugirió que la reacción no se había efectuado, pero la comparación de las señales de los protones del compuesto de partida con las del obtenido mostró claras diferencias. En la **Figura 67** se muestra la superposición de ambos espectros registrados en  $\text{CDCl}_3$ : en negro el del compuesto de partida y en verde el del compuesto obtenido no identificado denominado **31**. La región a baja frecuencia del espectro del compuesto **31** muestra una distribución de los protones de tipo  $-\text{CH}_2-$  en una zona que abarca entre 2,7 y 3,6 ppm. En cambio los protones de tipo  $-\text{CH}_2-$  para **12** resuenan entre 2,8 y 3,3 ppm. Por otro lado, en la región de alta frecuencia se observa que los protones de **31** presentan mayor solapamiento que los protones correspondiente a **12**.



**Figura 67.** Espectros superpuestos de RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos **12** (en negro) y **31** (en verde).

Posteriormente, continuando con la caracterización de **31**, se realizaron otros tres experimentos de RMN. Mediante el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se confirmó de manera definitiva la ausencia del grupo carbamato (Anexo C, p. 219). A través del experimento DEPT-135 (Anexo C, p. 220) se determinó que de los seis carbonos  $\text{sp}^3$ , dos correspondían a los tipos  $-\text{CH}_3$  o  $>\text{CH}-$  y los otros cuatro a  $-\text{CH}_2-$ . Por último, se realizó un experimento de HMBC (Anexo C, p. 220) que mostró el acoplamiento entre el protón observado a 5,24 ppm con uno de los carbonos de tipo  $>\text{CH}-$  o  $-\text{CH}_3$  observados en el experimento DEPT-135. En la **Figura 68** se encuentra un segmento del gráfico del experimento HMBC que abarca desde 2,5 hasta 5,5 ppm para los protones y entre 15 y 80 ppm para los carbonos. El gráfico completo se encuentra en el Anexo C, p. 220.



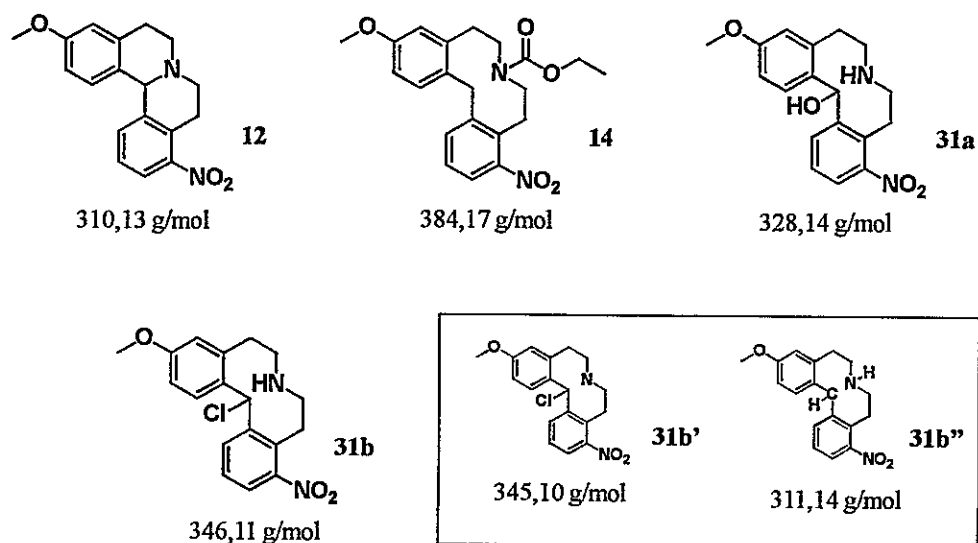
**Figura 68.** Segmento del gráfico del experimento de HMBC que abarca desde los 2,5 hasta 5,5 ppm para protones y entre 15 y 80 ppm para  $^{13}\text{C}$ , para el compuesto no identificado **31**. El gráfico se acompaña por el resultados de: RMN  $^1\text{H}$  (arriba) y de DEPT-135 (costado izquierdo).

El acoplamiento entre los carbonos de tipo  $>\text{CH}-$  o  $-\text{CH}_3$  se señala por medio de líneas verdes.

Los resultados de la espectrometría de RMN sugieren que efectivamente la reacción de apertura del anillo se efectuó, pero a diferencia de lo esperado, ocurrió con la pérdida del grupo carbamato y con la inclusión de un átomo diferente a H o C en el C-14. A partir de lo anterior se realizó cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución ambas acopladas a espectrometría de masas (CGM y HPLCM respectivamente). Los resultados se encuentran en el Anexo B, p. 218 y p. 19 respectivamente. En la CGM se observó un único compuesto con valores de  $m/z$  de 309,3 y de 310,3 en una razón de 10:5 y en el HPLCM se observó picos con  $m/z$  de 311,1385 y 345,1701 en una relación de abundancia de 100:7 respectivamente.

Los resultados del CGM concuerdan con la masa molar esperada para el compuesto **12** pero, dado los análisis espectrométricos realizados, se descarta que la reacción no haya ocurrido. Según las especies existentes en el medio de reacción, existen dos potenciales nucleófilo que

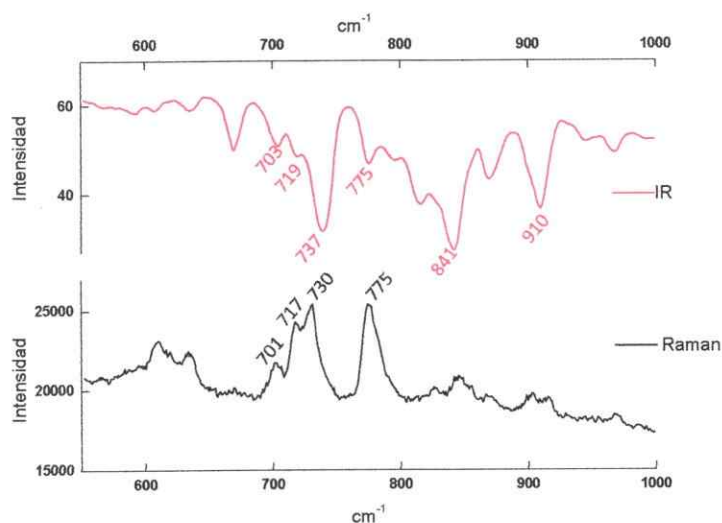
podrían reaccionar con el C-14 antes que el hidruro proveniente del agente reductor. Uno de ellos es el hidroxilo proveniente de moléculas de agua (absorbidas del medio, por un eventualmente pobre montaje de sistema anhidro requerido) lo que formaría el compuesto **31a**. La otra opción es el cloruro proveniente del cloroformiato de etilo, lo que formaría el compuesto **31b**. Según las masas obtenidas en ambas espectrometrías se descarta **31a**, y si bien la masa molecular de **31b** no se pudo determinar de manera exacta, las razones  $m/z$  obtenidas en HPLCM podrían corresponder a los fragmentos **31b'** y **31b''** (Figura 69).



**Figura 69.** Masas moleculares físicas de los compuestos: **12**, **14** y propuestas para **31a** y **31b**. Enmarcados, probables fragmentos de **31b** observados en HPLCM.

Para corroborar la obtención de **31b**, se registraron espectros de infrarrojo (IR) y Raman entre 400 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  con el fin de observar en la zona de la huella dactilar la presencia del enlace C-Cl activo entre 700 y 750  $\text{cm}^{-1}$  (Socrates, 1980). Ambos espectros se reproducen completos en el Anexo C, p. 221 y en la **Figura 70** se encuentra un segmento que abarca entre los 500 y los 1000  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro de IR mostró una banda intensa y ancha a 738  $\text{cm}^{-1}$  que, si bien se podría

asignar directamente a la interacción C-Cl, también podría corresponder a la absorción del enlace N-H de la amina secundaria (Socrates, 1980) presente en la molécula. Por esto, se propone que la anchura de la banda observada a  $738\text{ cm}^{-1}$  se podría deber a la presencia de ambas funciones. En el espectro de Raman se observó una banda intensa a  $730\text{ cm}^{-1}$  que fue asignada al enlace C-Cl. Esta asignación responde a que el átomo de Cl presenta una mayor polarizabilidad electrónica que el átomo de N, el cual al estar unido a hidrógeno no presenta un enlace activo en el espectro de Raman. Otra banda intensa observada en el espectro de Raman a  $775\text{ cm}^{-1}$  se asignó al movimiento en conjunto de los átomos del anillo alifático (“ring breathing”, (Kagel, 2000)).

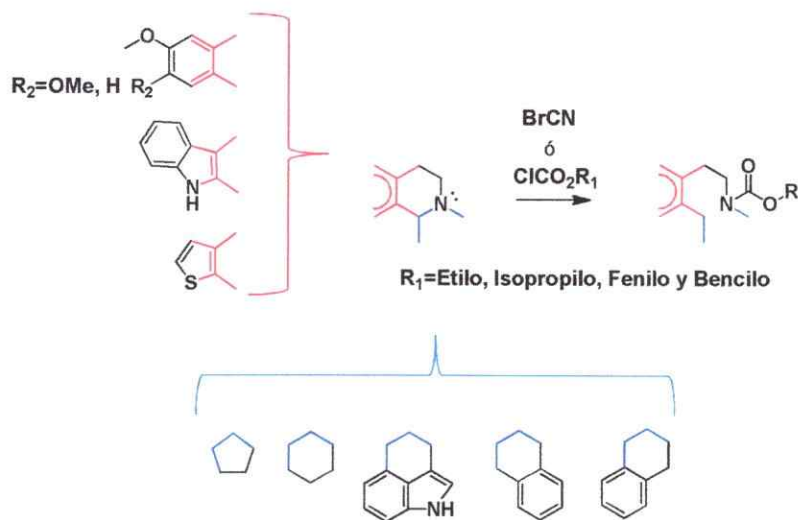


**Figura 70.** Espectros de IR (línea roja) y de Raman (línea negra) del compuesto **31b**. Segmento que abarca entre los  $500$  y los  $1000\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro se consignan los números de ondas de las bandas de absorción importantes.

Los resultados anteriores dan cuenta de que la reacción para la formación de **14** no se efectuó en las condiciones planteadas y en su lugar se produjo el nuevo compuesto 14-cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenz[*d,g*]acecina (**31b**) con un rendimiento de 87%.

### Propuesta de mecanismo de formación de 31b

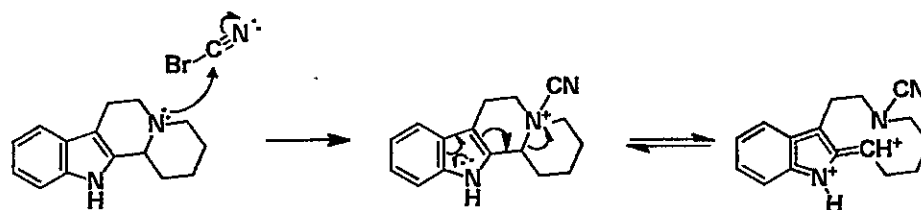
La apertura del anillo bicíclico realizada por medio de cloroformiato de etilo, exitosa en la obtención del compuesto **8**, ha sido utilizada en varias familias de alcaloides con el mismo fin. En la **Figura 71** se resumen los segmentos estructurales que han conformado las moléculas estudiadas (Sakai y col., 1973; Sakai y col., 1976; Calverley y col., 1981; C. T. Liu y col., 1983; Maryanoff y Almond, 1986; Schill y col., 1987; Bonjoch y col., 1998; Robaa y col., 2011). En todos los casos existe un segmento aromático electrondonor (en rojo, **Figura 71**) y un segundo segmento alifático (en azul, **Figura 71**), el que puede o no estar acompañado de un segmento aromático. Además la utilización de bromuro de cianógeno, cloroformiato de isopropilo, de fenilo y de bencilo como reactivos promotores de la apertura del biciclo, ha sido igual de exitosa.



**Figura 71.** Segmentos que han conformado la estructura de la amina bicíclica.

El mecanismo de reacción propuesto para la apertura del biciclo tipo octahidro-1*H*-quinolicina es de tipo  $S_N1$ , donde el grupo aromático electrondonor estabiliza el carbocatión generado

(Figura 72) subsecuente a la unión del carbamato o nitrilo y ruptura del enlace compartido por los biciclos (Calverley y col., 1981).



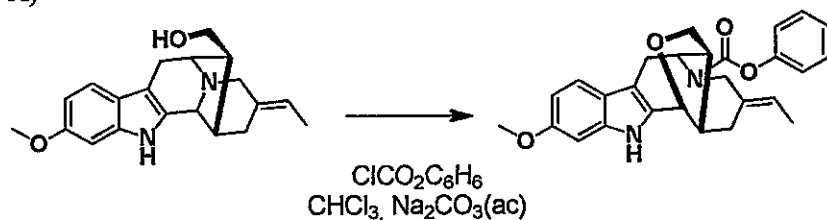
**Figura 72.** Mecanismo de apertura del biciclo; generación del carbocatión (Calverley y col., 1981).

Un vez formado el carbocatión se ha observado, según los productos obtenidos, que la reacción prosigue con un ataque nucleofílico, donde el nucleófilo proviene de la misma molécula o del medio de reacción, o con la formación de un producto de eliminación (Figura 73). Para que el ataque nucleofílico proceda de forma intramolecular, la reacción depende de la disponibilidad de un nucleófilo dentro de la molécula (Figura 73 A y B), y de su cercanía al carbocatión. Cuando el nucleófilo se encuentra cerca, la reacción intramolecular se desarrollará independientemente de los nucleófilos del medio ((Sakai y col., 1973), Figura 73 A). En cambio si existe mayor distancia del nucleófilo al centro positivo, la reacción intramolecular competirá con un ataque nucleofílico del medio ((Calverley y col., 1981), Figura 73 B). Como nucleófilo proveniente del medio se ha observado la entrada de hidroxilo (desde agua (Sakai y col., 1973; Bonjoch y col., 1998)), alcoxilo (desde alcoholes: MeOH (Calverley y col., 1981), EtOH (Sakai y col., 1976), alcohol bencílico (Schill y col., 1987)) e hidruro (desde NaCNBH<sub>3</sub> (Bonjoch y col., 1998; Robaa y col., 2011)) donde las condiciones de entrada del nucleófilo hidruro son las propuestas para la formación del compuesto 14. En cuanto al producto de eliminación se ha observado como único, al realizar la reacción en solventes como tolueno, o como producto secundario que compite con

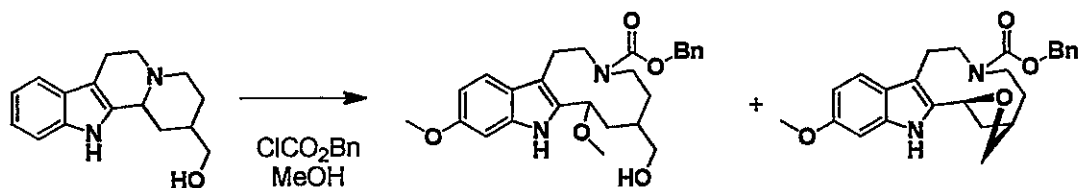


la solvólisis, cuando la reacción se desarrolla en solventes nucleofílicos; en ambos casos la estructura debe presentar un segmento molecular apropiado para la formación del doble enlace ((C. T. Liu y col., 1983) **Figura 73 C**).

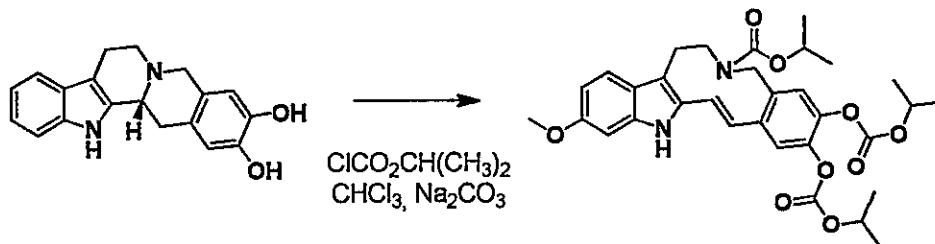
A)



B)



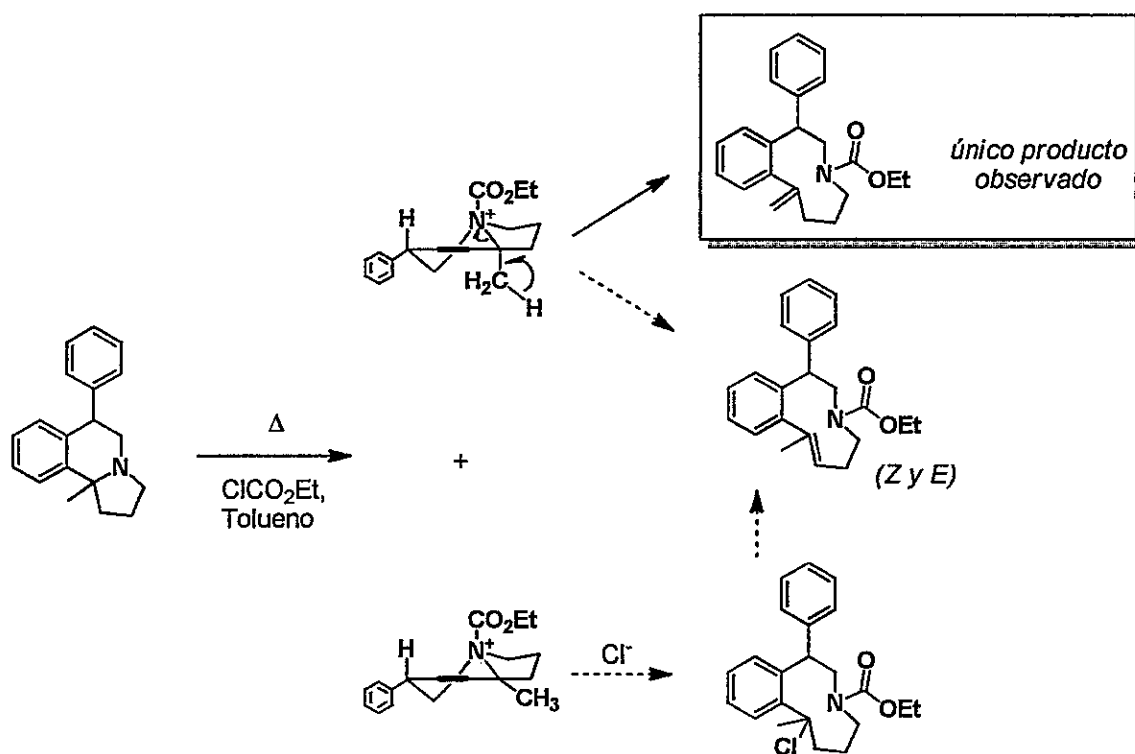
C)



**Figura 73.** Reacciones que conducen a la apertura del bicyclo tipo octahidro-1H-quinolicina: primero en presencia de diferentes fuentes de nucleófilos **A)** nucleófilo intramolecular (Sakai y col., 1973) y **B)** competencia entre nucleófilo intramolecular y solvolisis (Calverley y col., 1981) y segundo, **C)** obtención del producto de eliminación (C. T. Liu y col., 1983).

Entre los antecedentes existentes de la reacción de apertura del bicyclo, no se ha encontrado mención de un producto clorado como respuesta al ataque nucleofílico del cloruro al cabocación, pero sí ha sido propuesto como parte del mecanismo de formación de un producto de

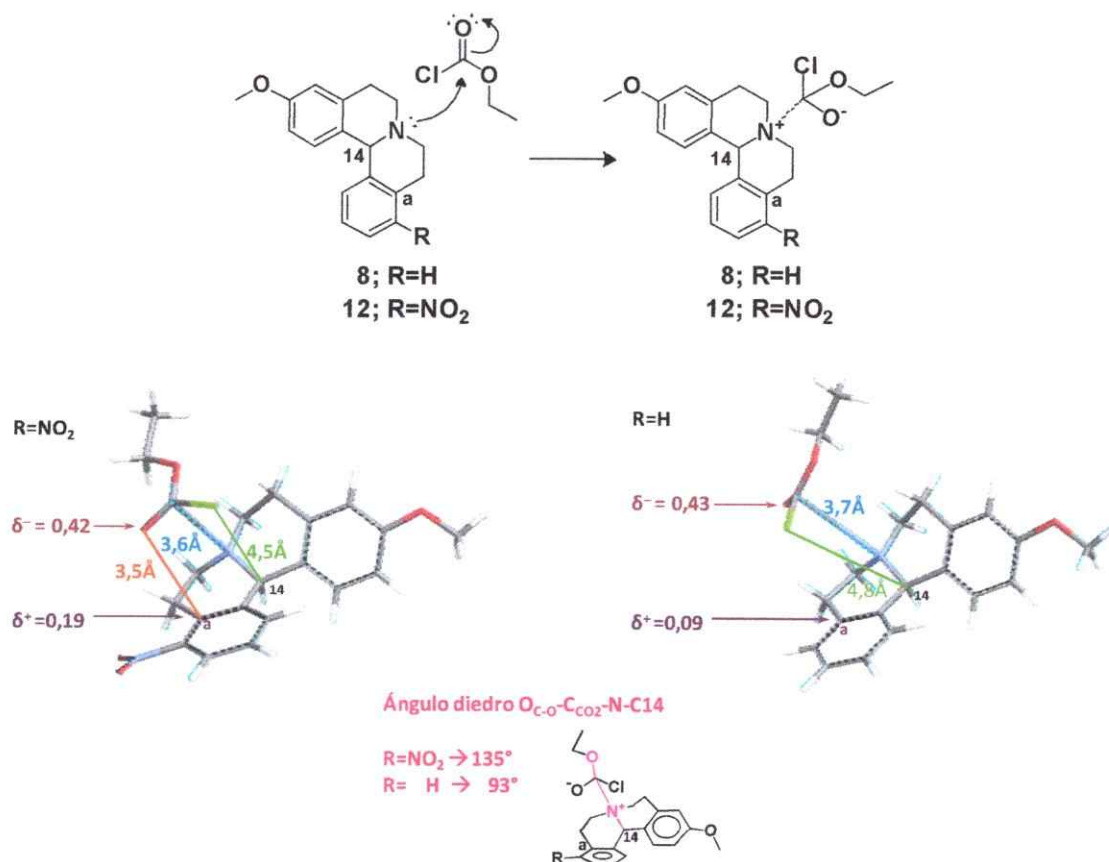
eliminación (Maryanoff y Almond, 1986). En esa oportunidad, este intermediario finalmente fue descartado como parte del mecanismo, ya que su existencia produciría dos productos de eliminación no aislados como resultado de la reacción (Figura 74).



**Figura 74.** Reacción que propone como parte del mecanismo de la apertura del bicyclo, el paso por un derivado clorado (Maryanoff y Almond, 1986). Las flechas discontinuas indican las conclusiones de los autores, las cuales explican que el derivado clorado no se genera.

La formación de **31b** se puede explicar considerando dos etapas. La primera es el ataque nucleofílico del cloruro al carbocatión centrado en el C-14 y la segunda es la salida del residuo formiato de etilo (-CO<sub>2</sub>Et) de la molécula. Para estudiar la primera etapa de reacción, se propuso un intermediario formado una vez unido el cloroformiato de etilo a la amina y se realizó sobre él,

un cálculo de minimización de energía y de potencial electrostático. Para ello, se tomó como compuestos de partida a **8** (precursor de 3MOD) y su derivado nitrado **12** (Figura 75).



**Figura 75.** Arriba, formación del intermediario de reacción propuesto dado por la unión del cloroformiato de etilo a la molécula **8** o **12**. Abajo, estructuras de mínima energía de los intermediarios propuestos. Se señala en números rojos las cargas parciales del oxígeno carbonílico y en morado las cargas parciales del carbono marcado con **a**; se destaca en línea discontinua celeste la distancia entre el carbono carbonílico del formiato de etilo y el nitrógeno al cual se une, en línea continua verde la distancia entre el cloro y el C-14 y en el caso del derivado nitrado se destaca en línea continua naranja la distancia entre oxígeno carbonílico y el carbono-**a**. Además se informa en la parte inferior el ángulo diedro O<sub>C-O</sub>-C<sub>CO<sub>2</sub></sub>-N-C14 para ambos derivados.

El cálculo mostró que, en el carbono a del intermediario propuesto proveniente de **12**, se genera una carga parcial positiva equivalente a 0,19 electrón, diferente a lo observado en la molécula no nitrada (proveniente de **8**) equivalente a 0,09 electrón. La diferencia en las cargas parciales positivas se asocia a la presencia o ausencia del grupo nitro, el cual puede promover por efecto inductivo y resonante la disminución de la densidad de carga del carbono a. Como consecuencia, en el derivado nitrado se observa que el oxígeno carbonílico que estabiliza una carga negativa se posiciona sobre el carbono a. Esta conformación, descrita con un ángulo diedro  $O_{C=O}-C_{CO_2}-N-C_{14}$  de  $135^\circ$ , conlleva a que el átomo de cloro se posicione sobre el C-14. Las diferencias observadas en el derivado nitrado sugieren que el cloro se uniría al C-14 por medio de un ataque nucleofílico intramolecular, condicionado por la conformación promovida por la presencia del grupo nitro en la molécula. Esta reacción intramolecular podría considerarse como una variación del ataque intramolecular observado por Sakai *et al.*, 1973 (Figura 73 A).

La reacción propuesta para la obtención de **14** y desarrollada exitosamente para la obtención de su análogo no nitrado **8**, es planteada en dos pasos sintéticos sin aislación de los intermediarios (1-.ClCO<sub>2</sub>Et, THF<sub>(seco)</sub>, -65 °C, 4 h; 2-. NaCNBH<sub>3</sub>, THF, 25 °C. Figura 47, paso iv) y Figura 66, paso ii)). Según lo anterior, la aislación de **31b** en un 87% no puede dar cuenta de si la salida del grupo -CO<sub>2</sub>Et ocurrió en el paso sintético 1 o 2, por lo cual se proponen dos opciones para explicar la segunda parte del mecanismo de formación de **31b**. En la primera opción, si la salida del grupo -CO<sub>2</sub>Et ocurre antes de agregar el nucleófilo hidruro, se propone un mecanismo de tipo concertado. En él, el ataque nucleofílico intramolecular del cloro al C-14 produciría de forma concertada la salida del segmento -CO<sub>2</sub>Et. Como segunda opción se propone que la salida del grupo -CO<sub>2</sub>Et es debida a la presencia del nucleófilo hidruro en el medio de reacción.

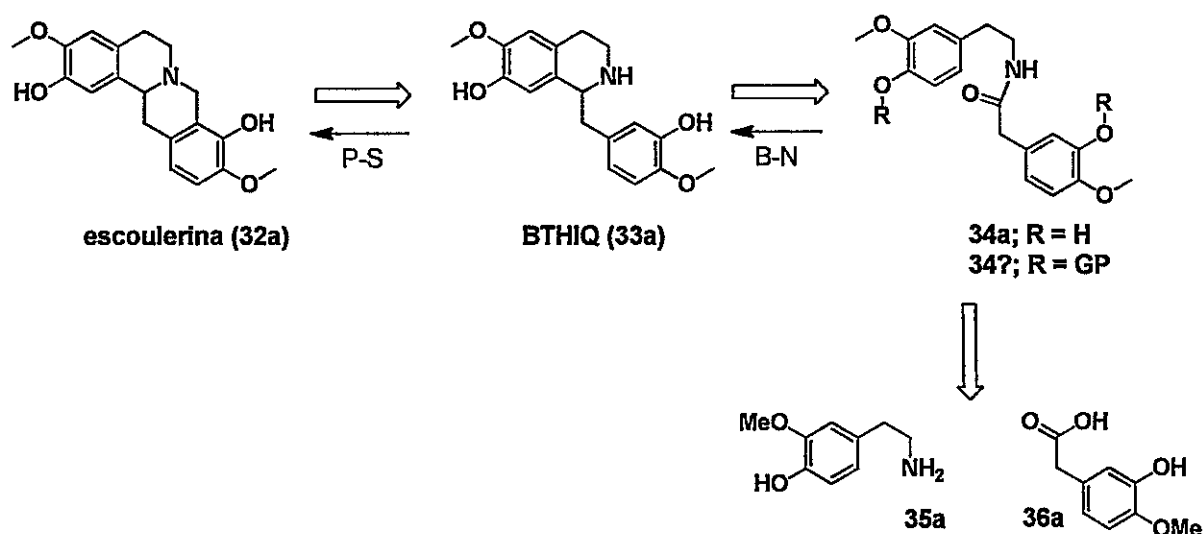
Para evaluar cual de las opciones mecanísticas se ajusta al resultado experimental (obtención de **31b**) se propone, como trabajo posterior a esta tesis doctoral, aislar y/o detectar el intermediario formado antes de agregar la fuente de hidruro. Estos resultados podrían entregar mayor

información para proponer un mecanismo que se ajuste a lo que ocurre en el medio de reacción. Considerando la formación del compuesto **31b** en las condiciones planteadas para la obtención de **14**, la hipótesis de utilizar como opción precursora de la función amino un grupo nitro (ver p. 111), no se cumple y en su lugar se genera una nueva especie química de características y por un mecanismo antes no informados.

### Síntesis de derivados halogenados en C-12 de escoulerina

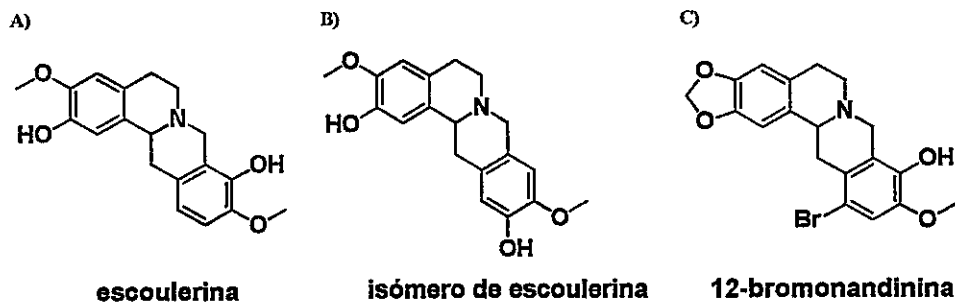
En la sección de resultados de simulación molecular se discutió que los derivados de boldina no presentan constantes de afinidad que reflejen directamente la presencia de un puente de halógeno en la interacción con el receptor. Además se planteo, según los trabajos realizados por Mo y col. (donde se observó que la 12-cloroescoulerina incrementó su valor de  $IC_{50}$  en el  $D_1$  en 5 veces, con respecto al compuesto no halogenado) (Jiao y col., 2007), que potencialmente los derivados de escoulerina halogenados en el C-12 podrían incrementar su afinidad por  $D_1$  a través de una interacción de tipo puente de halógeno. Considerando lo antes planteado se realizó la síntesis de 12-bromoescoulerina (**32b**) y 12-cloroescoulerina (**32c**).

La síntesis total de escoulerina (**32a**) involucra dos pasos claves (**Figura 76**). El primero de ellos es la formación de una benciltetrahidroisoquinolina (**33a**, BTHIQ) por medio de una reacción de Bischler-Napieralski a partir de una amida (**34a**), la cual a su vez está formada por la 3-metoxi-4-hidroxifeniletamina (**35a**) y el ácido 4-metoxi-3-hidroxifenilacético (**36a**). Antes de someterla a la reacción de Bischler-Napieralski la amida debe tener sus funciones hidroxilos protegidos. El segundo paso es la formación de la tetrahidroprotoberberina por medio de la ciclación de la BTHIQ a través de una reacción de Pictet-Spengler (Kametani y Ihara, 1967; Kametani y col., 1969).



**Figura 76.** Representación retrosintética y sintética de los pasos claves para la formación de escoulerina. Las reacciones de Pictet-Spengler y de Bischler-Napieralski se representan por P-S y B-N respectivamente. La simbología GP en las estructuras y el símbolo “?” en la numeración representan un grupo protector.

Para que la ciclación sea selectiva en la formación de escoulerina y no se forme su isómero estructural coreximina (también conocido como coramina, **Figura 77**). Kametani e Ihara (1967) realizaron la síntesis de la primera a partir de la 2-bromoBTHIQ correspondiente, obtenida a partir de una halogenación directa de la BTHIQ precursora con  $\text{Br}_2$  en ácido acético (AcOH). Posteriormente (1969) este mismo grupo obtuvo otro derivado de protoberberina halogenado en la posición 12 (12-bromonandina, **Figura 77**), partiendo esta vez desde la 3,4-metilendioxfeniletilamina y el ácido **36a** bromado en *para* con respecto al grupo hidroxilo que a su vez se encontraba protegido. (Kametani y col., 1969)



**Figura 77.** Estructuras de: A) escoulerina, B) coreximina o coramina, y C) 12-bromonandinina.

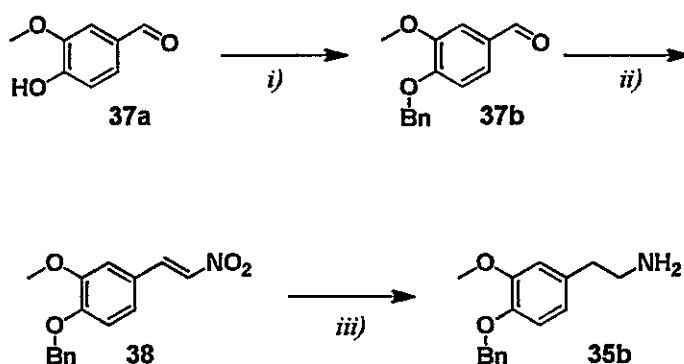
#### *Síntesis de precursores de la amida 34?*

Se propuso formar **34** utilizando la amina **35a** y el ácido **36a** protegidos en sus funciones hidroxilo. En el caso de la amina se utilizó el grupo bencilo (amina **35b**). En el caso del ácido los tres grupos protectores evaluados fueron bencilo (Bn), 2-metoxietoximetilo (MEM) y etoximetoxilo (EOM) dando paso a los ácidos protegidos **36b**, **36c** y **36d** respectivamente.

#### *Amina 35b*

La amina **35b** se sintetizó por medio de tres pasos sintéticos, mostrados en la **Figura 78**. En ellos se utilizó 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**37a**) como compuesto de partida, obteniéndose un rendimiento total de 19% una vez formado el clorhidrato de **35b**. Uno de los mayores problemas identificados en esta ruta sintética surgió en el tratamiento de la mezcla de reacción una vez finalizada la reducción de **38**, para la formación del clorhidrato. Para mejorar la obtención de **38** y evitar la formación de un precipitado de difícil tratamiento al eliminar el excedente de  $\text{LiAlH}_4$ , se reemplazó la solución de NaOH diluido, utilizada en un principio, por una solución saturada de tartrato de sodio y potasio. Con ella se obtuvo un precipitado fino y

manejable que mejoró la separación de la amina de la mezcla de reacción, obteniéndose un rendimiento de 89% de un aceite amarillo. Para evitar la disminución del rendimiento en la formación del clorhidrato, a modo de purificación se realizó una destilación a presión reducida (7 torr, 210 °C) y la amina libre, obtenida ahora con un rendimiento total de 39%, se utilizó directamente en el paso siguiente (formación de la amida). La bencilación del aldehído **37a** y la formación del nitroestireno **38** ocurren con un rendimiento de 88% en ambos casos.



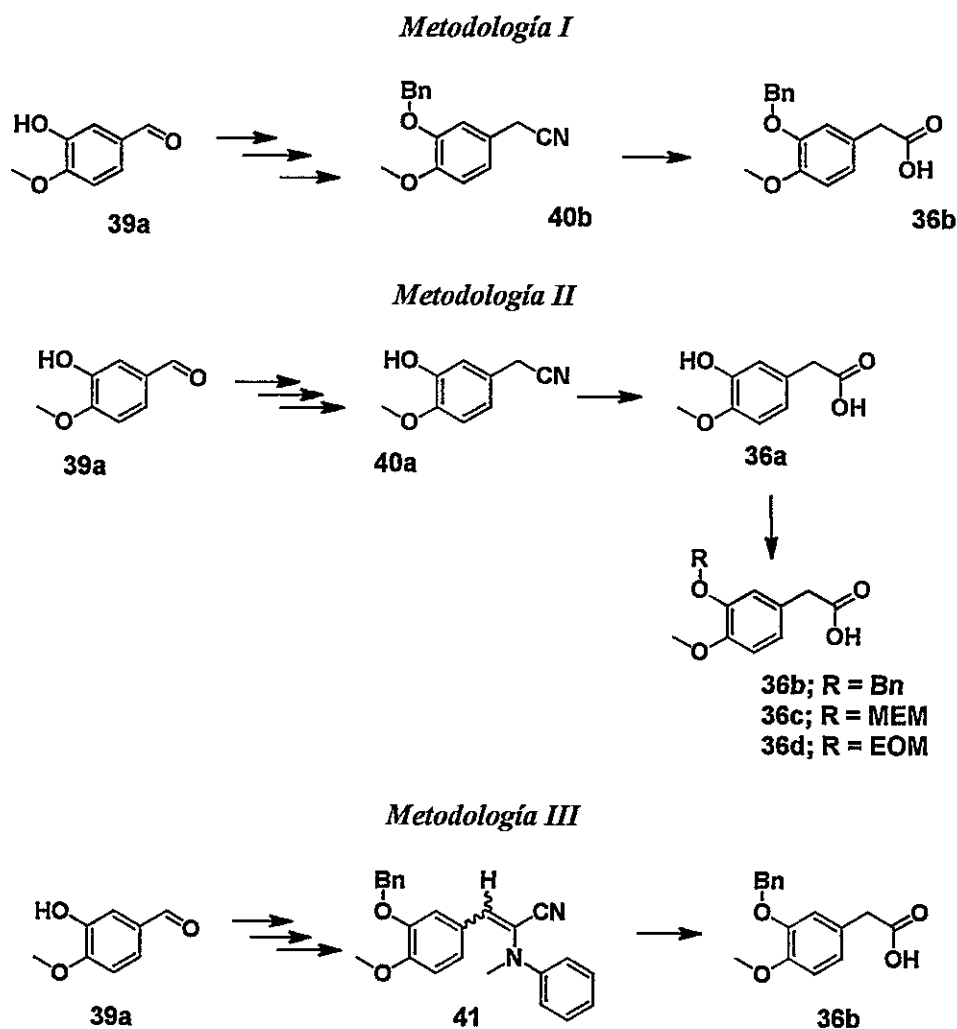
**Figura 78.** Síntesis de **35b**. *i)* BnCl, EtOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, refluxo; *ii)* CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>; *iii)* 1- LiAlH<sub>4</sub>, THF, refluxo; 2- IPA, éter etílico, HCl.

*Ácido 3-hidroxi-4-metoxifenilacético 36a y protección de su hidroxilo: formación de 36b, 36c y 36d.*

Para obtener el ácido **36a** protegido se siguieron tres metodologías (**Figura 79**), según los reactivos disponibles en el laboratorio, utilizando como compuesto de partida 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído o isovainillina (**39a**). La primera de las metodologías ensayadas tuvo como fin obtener **36b** directamente por medio de la hidrólisis de fenilacetónitrilo **40b**, con el cual se propuso alargar la cadena del aldehído en un carbono. La segunda, similar a la metodología anterior, pretendió obtener **36b** por medio de la hidrólisis de **40a** y posteriormente obtener **36b**,



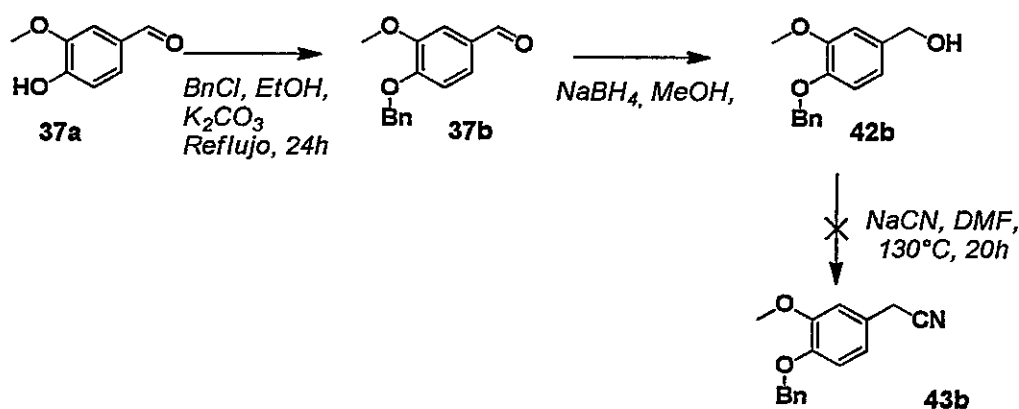
**36c** o **36d**. Finalmente la tercera metodología tuvo como fin obtener **36b** directamente por medio de la hidrólisis de la  $\alpha$ -cianoenammina **41**. Es importante destacar que el aldehído **39a** tiene un precio comercial mucho mayor que su isómero estructural 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído o vainillina (**37a**) por lo cual, todas la reacciones fueron evaluadas primero con **37a**.



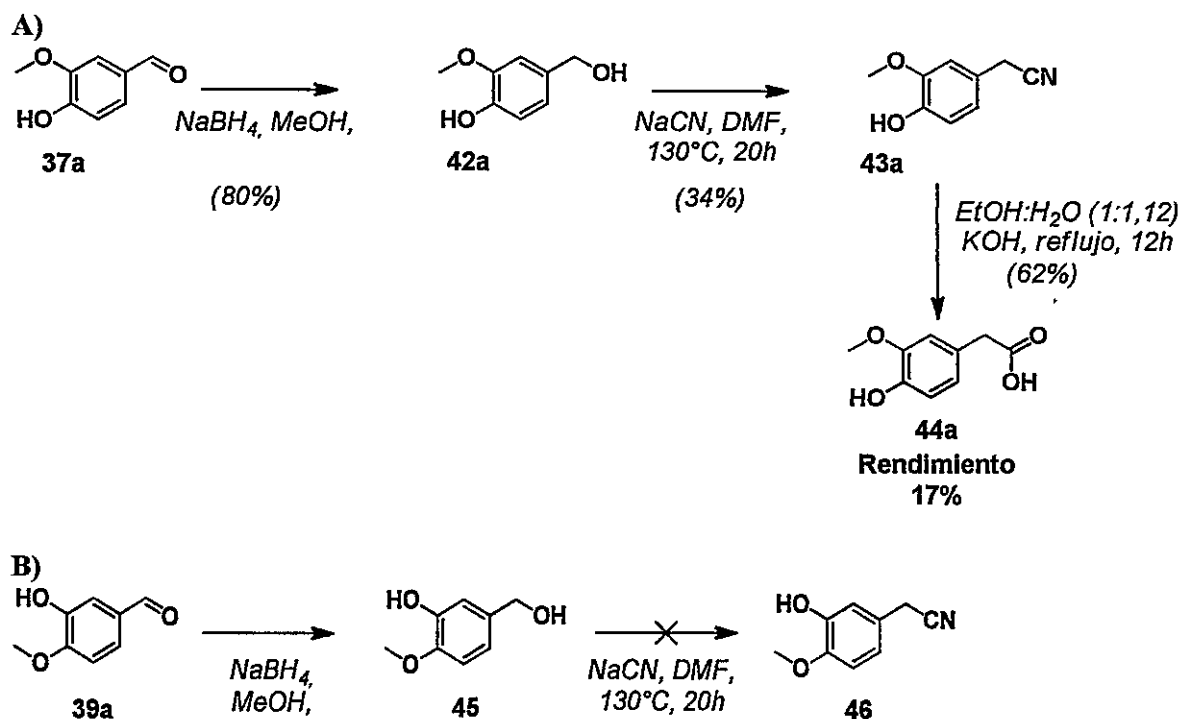
**Figura 79.** Metodologías utilizadas para la formación de **36a** y sus derivados: **b**, **c** ó **d**.

## Metodologías I y II

La ruta sintética desarrollada en la metodología I se detalla en la **Figura 80** y la desarrollada en la metodología II se detalla en la **Figura 81**. De la metodología I solo se pudieron realizar los primeros dos pasos, ya que la sustitución del hidroxilo alcohólico por un grupo ciano no transcurrió, posiblemente debido a la desactivación mediada por resonancia del anillo aromático al realizarse la protección del hidroxilo. A partir de lo anterior se evaluó no proteger la vainillina y seguir con la ruta de la sustitución del hidroxilo por un grupo ciano (metodología II). Esta vez la síntesis propuesta pudo concluir con la hidrólisis exitosa del nitrilo, obteniéndose un rendimiento total de 17% (desde el aldehído, **Figura 79 A**). Considerando que la metodología II fue exitosa, se evaluó partiendo desde isovainillina sin lograr en este caso la sustitución del grupo hidroxilo por ciano (**Figura 79 C**).

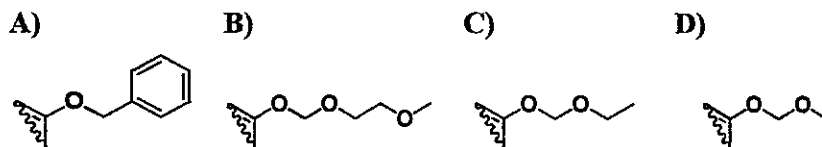


**Figura 80.** Rutas sintéticas utilizadas en las metodologías I desde vainillina

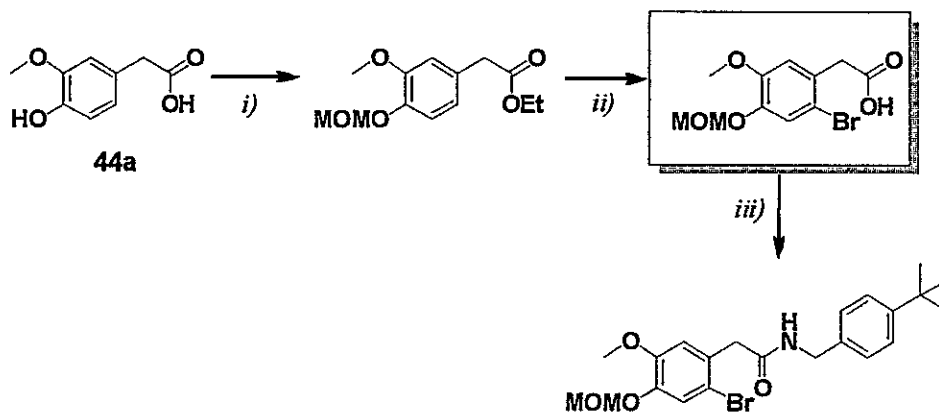


**Figura 81.** Rutas sintéticas utilizadas en las metodologías II. A) desde vainillina y B) desde isovainillina.

Una vez obtenido 44a y comprado 36a se evaluaron diferentes metodologías de protección del grupo hidroxilo aromático con el fin de continuar con la ruta propuesta en la **Figura 76** y la metodología II para obtener los derivados protegidos de 36a. Los grupos protectores que se evaluaron fueron el bencilo (Bn), 2-metoxietoximetilo (MEM) y etoximetoxilo (EOM) (**Figura 82**). El Bn se probó debido a su utilización en la síntesis referencial de escoulerina (Kametani y Ihara, 1967; Kametani y col., 1969) y los grupos MEM y EOM por su similitud al grupo metoximetilo (MOM, **Figura 80 D**), que había sido utilizado como grupo protector en la obtención del ácido 2-(2-bromo-4-metoximetil-3-metoxifenil)acético precursor de una amida similar a 34a (**Figura 83**) (Kang y col., 2010).

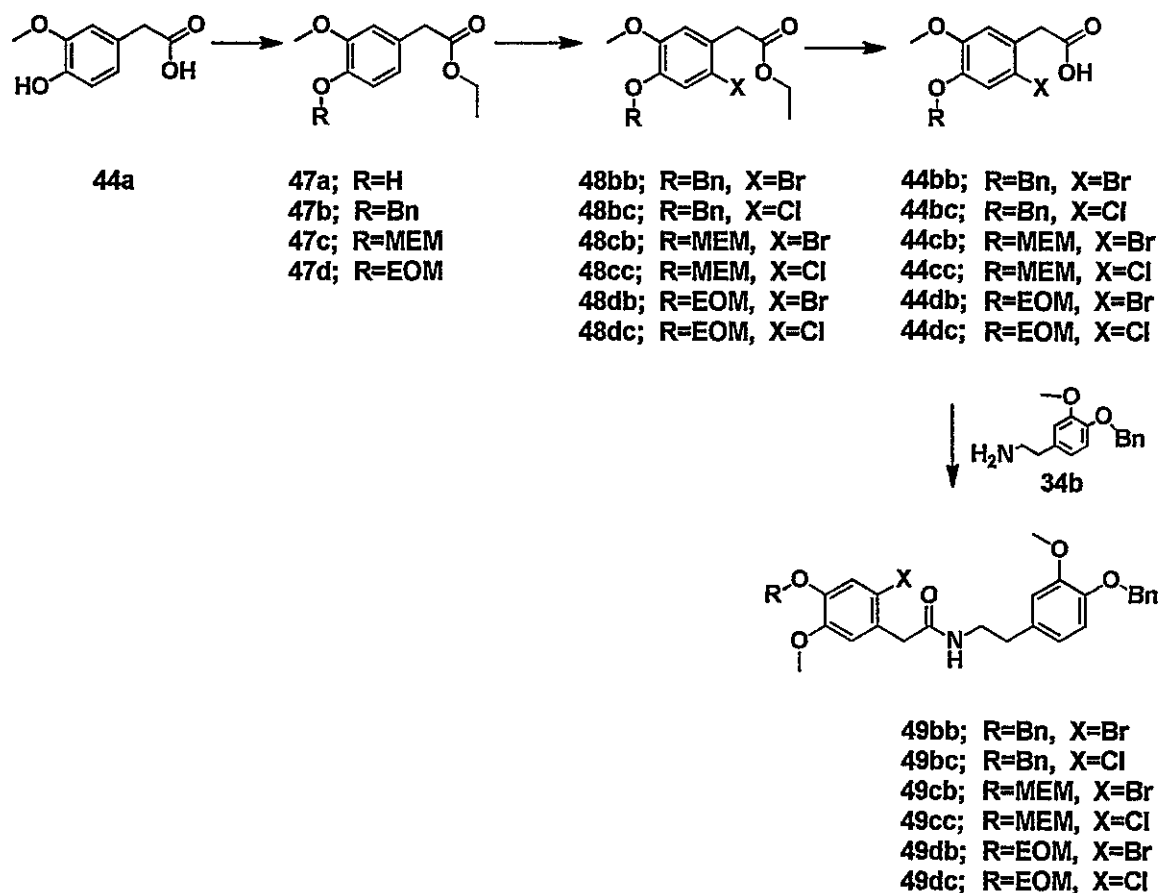


**Figura 82.** Grupos protectores estudiados: **A)** bencilo (Bn), **B)** 2-metoxietoximetilo (MEM) y **C)** etoximetoxilo (EOM). **D)** Grupo protector referencial: metoximetilo (MOM).



**Figura 83.** Síntesis que utiliza el grupo protector MOM en la bromación del ácido 2-(2-bromo-4-metoximetil-3-metoxifenil)acético (compuesto enmarcado). *i)* 1-.  $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{cat})$ , EtOH, reflujo 99%; 2-. MOMCl, DBU, DMF, 87%; *ii)* 1-. oxone, NaCl, acetona- $\text{H}_2\text{O}$ , 79% para X = Cl; oxone, NaBr, acetona- $\text{H}_2\text{O}$ , 91% , para X = Br; 2-. NaOH, THF- $\text{H}_2\text{O}$ , 94-98%, *iii)* R-NH<sub>2</sub>, EDC, HOBt, Et<sub>3</sub>N, 1,4-dioxano.

Considerando los grupos protectores Bn, MEM y EOM en la **Figura 84** se esquematizan los pasos sintéticos que se comentarán a continuación.



**Figura 84.** Esquema de los pasos sintéticos de protección del grupo hidroxilo aromático del ácido **44a** y formación de la amida **49**.

El primer paso sintético, antes de proceder con la protección del grupo hidroxilo aromático de **44a**, fue realizar la esterificación de su hidroxilo carboxílico. Para ello se utilizó EtOH como fuente de grupo etilo y como solvente obteniéndose un rendimiento de 98%. Esta reacción de esterificación a diferencia de lo observado en la formación del compuesto **27** (p. 120), ocurre en menor tiempo y con mayor rendimiento, por lo que la inclusión de un grupo etilo como protector de una función ácida es una mejor opción que un grupo metilo.

El primer grupo protector del grupo hidroxilo aromático de **47a** evaluado fue el grupo bencilo (Bn). Las condiciones de reacción se detallan en la **Tabla 27**. En todos los casos se observó, por medio de CCF, la formación de un compuesto de menor polaridad (atribuido a **47b**) y que la reacción se detiene a las pocas horas de iniciado el proceso. A partir de lo anterior, y ya que las pruebas de reacción se realizaron a pequeña escala, no se aisló el producto.

**Tabla 27.** Condiciones de reacción evaluadas en la formación del compuesto **47b**.

| Nº               | Condiciones de reacción <sup>a</sup> |  |          |          |            |
|------------------|--------------------------------------|--|----------|----------|------------|
|                  | Fuente de G.P.                       | Base o activante                         | Solvente | Temp. °C | Tiempo (h) |
| I                | Bn-Cl (1,2 eq.)                      | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,5 eq.) | EtOH     | reflujo  | 24         |
| II <sup>1</sup>  | Bn-Br (1,2 eq.)                      | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,5 eq.) | DMF      | 30       | 24         |
| III <sup>2</sup> | Bn-Br (1,2 eq.)                      | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,5 eq.) | MeCN     | 75       | 24         |

<sup>a</sup> equivalentes (eq.) con respecto a 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acetato de etilo (**47a**); <sup>1</sup>(Reddy y col., 2008); <sup>2</sup>(Magnus y col., 2010)

Los grupos protectores MEM y EOM presentan características químicas similares, por lo cual fueron evaluados en forma paralela. Las condiciones de reacción para la síntesis de los compuestos **47c** y **47d** se monitorearon por medio de CCF y se resumen en la **Tabla 28**. En todos los casos quedó remanente del compuesto de partida y se aisló el producto en las situaciones en las cuales se observó mayor avance de la reacción. Si bien el grupo protector que fue evaluado en el mayor número de condiciones fue MEM debido a que el producto presentaba una fácil separación a través de cromatografía en columna, nunca se observó un consumo considerable del compuesto de partida, por lo que finalmente fue escogido EOM como grupo protector. De las metodologías estudiadas, la utilización de la mezcla compuesta por: 2 eq. de DIPEA y 0,1eq. mol DMAP como base (eq. con respecto a la cantidad de sustrato) y DCM como solvente (ensayos **VI** y **IX**), fue la que condujo a un mayor avance de la reacción. En estos ensayos se obtuvieron rendimientos de 65% y de 73% para la protección de **47a** con MEM y

EOM respectivamente, derivados caracterizados por RMN <sup>1</sup>H. La condición utilizada finalmente, en relación a las otras metodologías, probablemente fue exitosa debido a que fue aquella donde se utilizó una mayor cantidad de equivalentes de base con respecto al grupo hidroxilo a proteger.

**Tabla 28.** Pruebas de protección del grupo hidroxilo fenólico de 47a.

| N°                | Condiciones de reacción <sup>a</sup> |  |          |          |
|-------------------|--------------------------------------|--|----------|----------|
|                   | Fuente de G.P.                       | Base                                     | Solvente | Temp. °C |
| I <sup>1</sup>    | MEM-Cl (1,05 eq.)                    | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1 eq.)   | DMF      | 25       |
| II                | MEM-Cl (1,1 eq.)                     | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,1 eq.) | Acetona  | 55       |
| III <sup>2</sup>  | MEM-Cl (1,1 eq.)                     | NaH (1,2 eq.)                            | DMF      | 25       |
| IV                | MEM-Cl (1,3 eq.)                     | DBU (1,3 eq.)                            | DMF      | 25       |
| V <sup>3</sup>    | MEM-Cl (1,3 eq.)                     | DIPEA (1,3 eq.)                          | DCM      | 25       |
| VI <sup>4</sup>   | MEM-Cl (1,3 eq.)                     | DIPEA(2 eq.) ;10 % DMAP                  | DCM      | 48       |
| VII               | EOM-Cl (1,3 eq.)                     | DBU (1,3 eq.)                            | DMF      | 25       |
| VIII <sup>3</sup> | EOM-Cl (1,3 eq.)                     | DIPEA (1,3 eq.)                          | DCM      | 25       |
| IX <sup>4</sup>   | EOM-Cl (1,3 eq.)                     | DIPEA (2 eq.) 10 % DMAP                  | DCM      | 48       |

<sup>a</sup> equivalentes (eq.) con respecto a 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acetato de etilo (47a); <sup>1</sup>(Clark y col., 2004); <sup>2</sup>(Chai y col., 2003); <sup>3</sup>(Reichert y col., 2001); <sup>4</sup>(Beguin y col., 2006)

Una vez obtenido 47d, se utilizó como compuesto de partida en la halogenación de la posición 2 de su anillo aromático. Con ello, como se comentó anteriormente, se protegería esta posición en la ciclación que involucra la BTHIQ en pasos posteriores y se obtendrían los derivados de protoberberina halogenados en la posición 12.

Para la obtención de 48db y 48dc se evaluaron diferentes metodologías de reacción resumidas en la **Tabla 29**, que fueron monitoreadas por CCF utilizando técnicas de co-cromatografía.

En el caso de la bromación la reacción en condiciones heterogéneas donde se utilizó: NBS como

agente halogenante,  $\text{CHCl}_3$  como solvente y  $\text{SiO}_2$  como soporte (Tabla 29, ensayo VII) tuvo éxito obteniéndose un rendimiento de 90%. En los otros casos se observó la aparición de un compuesto con diferente razón de frente que el compuesto de partida, que al ser aislado y analizado por RMN  $^1\text{H}$  permitió concluir que efectivamente se había producido la halogenación pero que además se desprotegia la función hidroxilo formándose el compuesto **48ab** (ver espectro Anexo C, p. 226).

En el caso de la cloración no se observó un cambio en la  $R_f$  de los compuestos obtenidos en las reacciones evaluadas con respecto a la del compuesto de partida.

**Tabla 29.** Condiciones de reacción evaluadas en la síntesis de los compuestos **48db** y **48dc**.

| Nº                 | Condiciones de reacción <sup>a</sup> |                              |  |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
|                    | Agente halogenante                   | Solvente                     | Otro                                       |
| I <sup>1</sup>     | NaBr (4 eq.)                         | 1:1 Acetona:H <sub>2</sub> O | Oxone (2 eq.)                              |
| II                 | NaBr (1,1 eq.)                       | MeOH                         | Oxone (1,1 eq.)                            |
| III <sup>2</sup>   | Br <sub>2</sub> (0,5 eq.)            | CCl <sub>4</sub>             | 0°C  |
| IV                 | Br <sub>2</sub> (0,5 eq.)            | CCl <sub>4</sub>             | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1 eq.)     |
| V                  | Br <sub>2</sub> (0,5 eq.)            | CCl <sub>4</sub>             | DIPEA (1 eq.)                              |
| VI                 | NBS <sup>b</sup> (1,1 eq.)           | MeCN                         |  |
| VII <sup>3,4</sup> | NBS (1,1 eq.)                        | CHCl <sub>3</sub>            | 1 eq. en peso SiO <sub>2</sub> , oscuridad |
| VIII               | NCS <sup>b</sup> (1,1 eq.)           | CHCl <sub>3</sub>            | 1 eq. en peso SiO <sub>2</sub> , oscuridad |
| IX                 | NaCl (4 eq.)                         | 1:1 Acetona:H <sub>2</sub> O | Oxone (1 eq.)                              |
| X <sup>5</sup>     | SnCl <sub>4</sub> (2 eq.)            | DCM <sub>(seco)</sub>        | Pb(AcO) <sub>4</sub> (1 eq.)               |
| XI                 | SnCl <sub>4</sub> (1 eq.)            | DCM <sub>(seco)</sub>        | Pb(AcO) <sub>4</sub> (1 eq.)               |

<sup>a</sup> equivalentes (eq.) con respecto a 2-(4-etoximetoxi-3-metoxifenil)acetato de etilo (**47d**);

<sup>b</sup> NBS=N-bromosuccinimida; NCS= N-clorosuccinimida; <sup>1</sup>(Lee y col., 2002); <sup>2</sup>(Bezzu y col., 2012); <sup>3</sup>(Ito y col., 2005); <sup>4</sup>(Konishi y col., 1989); <sup>5</sup>(Muathen, 1996)

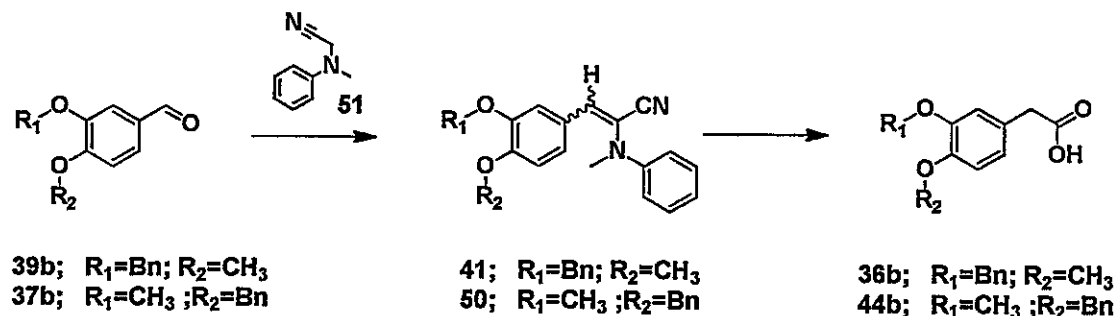


Las reacciones de bromación ensayadas ocurrirían por sustitución aromática electrofílica ( $S_{Ar}E$ , (Carey y Sundberg, 2007)) debida a la presencia o la generación in situ de  $Br_2$ , con liberación de HBr como producto secundario. La estabilidad de los grupos protectores tipo MOM ha sido informada como baja en reacciones de adición radicalaria en las cuales existe presencia de HBr. El gel de sílice ha sido utilizado en reacciones de cloración con diferentes agentes clorantes (Hojo y Masuda, 1975; K. Smith y col., 1985) y además se ha observado que en el caso de la utilización de hipoclorito de *ter*-butilo no habría la liberación HCl como producto secundario (K. Smith y col., 1985). Se han ensayado bromaciones con NBS en presencia de gel de sílice, donde la introducción de un bromo en el C-5 del compuesto 2,4-bis((2-metoxietoxi)metoxi)benzaldehído (con una metodología similar al ensayo VII) se informó con un rendimiento de 73% (Ito y col., 2005).

Que la bromación haya ocurrido sin desprotección de la función hidroxilo sólo en presencia de un captador de ácido (rol del gel de sílice), da cuenta de la alta sensibilidad de los grupos protectores tipo MOM a HX (donde X es un halógeno). La ruta sintética propuesta tiene como paso clave la formación de la BTHIQ (con funciones hidroxilo protegidas) por medio de la utilización de  $POCl_3$ , reacción que genera como producto secundario HCl. Según lo observado la liberación de HCl suscitaría la desprotección de los hidroxilos lo que complicaría la obtención de la BTHIQ. A partir de lo anterior se decidió reformular la ruta sintética para la obtención de la amida 34?

*Metodología III. Reformulación de la ruta sintética para la obtención de la amida 34?*

Esta metodología se basa en la síntesis informada para la obtención del ácido fenil acético desde benzaldehído por intermedio de una  $\alpha$ -cianoenammina (Takahashi y col., 1983). En el primero de los pasos se utilizó como compuestos de partida la *O*-bencilisovainillina (**39b**) y la *O*-bencilvainillina (**37b**). En el segundo paso se realizó una hidrólisis de las  $\alpha$ -cianoenaminas respectivas para formar los ácidos bencilados **36b** y **44b**. Para formar las  $\alpha$ -cianoenaminas mencionadas se utilizó  $\alpha$ -(*N*-metilanilino)acetonitrilo (**51**), una base y un solvente inerte. En la **Figura 85** se resumen los pasos mencionados previamente.



**Figura 85.** Metodología III desde *O*-bencilisovainillina (**39b**) y *O*-bencilvainillina (**37b**).

Para obtener el compuesto **51** se probaron 3 metodologías que tienen como reactivos de partida *N*-metilanilina, formaldehído y cianuro de sodio (**Figura 86**). Las variantes ensayadas en cada una de la reacciones son presentadas en la **Tabla 30**. Todas las condiciones fueron seguidas por CCF y debido a que el compuesto **51** es de fácil aislación y purificación (destilación a presión reducida, 6 torr y 140 °C) se informan los rendimientos de cada ensayo. La condición más favorable involucró la utilización de (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> como agente formilante y AcOH como solvente, con la cual se obtuvo un rendimiento de 52% del producto deseado.

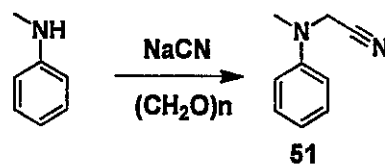


Figura 86. Formación de 51.

Tabla 30. Condiciones de reacción para formar 51.

| N°               | Condiciones de reacción <sup>a</sup> |   |          |                            |             |
|------------------|--------------------------------------|---|----------|----------------------------|-------------|
|                  | eq. NaCN                             | Agente formilante                         | Solvente | Otro                       | rendimiento |
| I <sup>1</sup>   | 1                                    | CH <sub>2</sub> O (1 eq.)                 | Agua     | NaHSO <sub>3</sub> (1 eq.) | 3%          |
| II <sup>2</sup>  | 1,5                                  | (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> (1,2 eq) | AcOH     | ZnCl <sub>2</sub> (1 eq.)  | 7,2%        |
| III <sup>2</sup> | 1,5                                  | (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> (1,2 eq) | AcOH     |                            | 52%         |

<sup>a</sup> equivalentes (eq.) con respecto a N-metilanilina; <sup>1</sup>(Allen y VanAllan, 1947); <sup>2</sup>(Dimroth y Aurich, 1965)

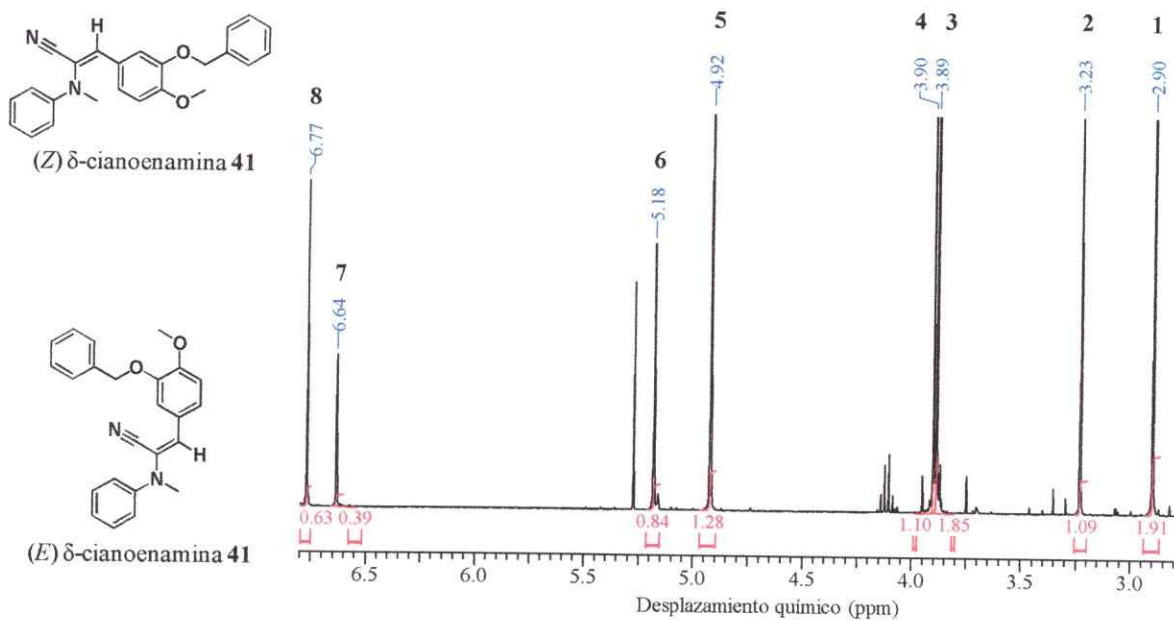
Una vez obtenido **51** se procede con la formación de las  $\alpha$ -cianoenaminas **41** y **50** (Figura 85). Para esto se evaluaron dos metodologías resumidas en la Tabla 31. La metodología en la cual se utilizaron condiciones de transferencia de fase (Tabla 31, ensayo II) dio como resultado un rendimiento de 79% para el compuesto **41** y de 72% para el compuesto **50**, rendimientos calculados luego de realizar las respectivas purificaciones por medio de columna cromatográfica "flash". Esta metodología había sido informada para la transformación del benzaldehído en  $\alpha$ -cianoenamina, en la cual se obtuvo un rendimiento de 78% al utilizar una temperatura de 50 °C por un periodo de 0,25 h (Jones, 2001). Si bien, los rendimientos obtenidos concuerdan con lo informado, la metodología utilizada se realizó con algunas modificaciones: incremento del tiempo de reacción de 0,25 h a 4,5 h (tiempo al cual se observó desaparición del aldehído) e incremento de la temperatura de 50 °C a temperatura de reflujo.

**Tabla 31.** Metodologías evaluadas en la formación de **41** y **50**.

| Nº                     | Condiciones de reacción <sup>a</sup>                    |                       |                   |
|------------------------|---|-----------------------|-------------------|
|                        | Base  | Solvente              | Otro              |
| <b>I</b> <sup>1</sup>  | NaH (1,1 eq.)   | THF <sub>(seco)</sub> | N <sub>2</sub>    |
| <b>II</b> <sup>2</sup> | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,1 eq.); KOH (5,8 eq.) | Benceno               | TBA-Br (0,25 eq.) |

<sup>a</sup> equivalentes (eq.) con respecto a  $\alpha$ -(*N*-metilanilino)acetonitrilo (**51**);<sup>1</sup>(Takahashi y col., 1983);  
<sup>2</sup>(Jones, 2001)

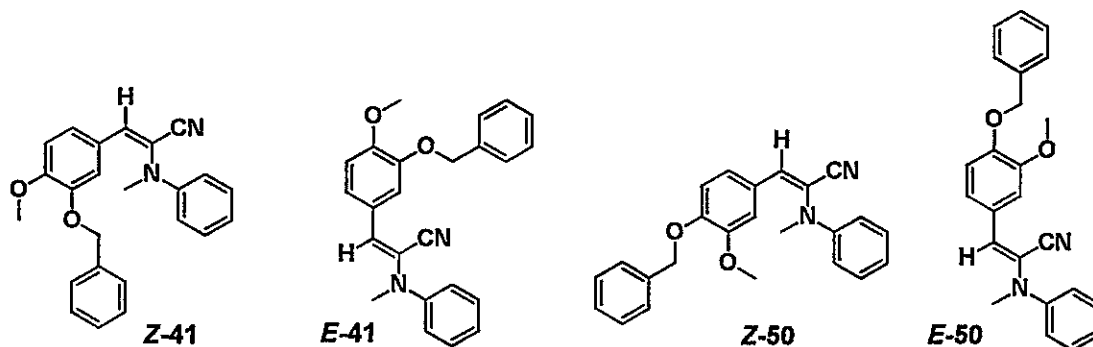
La cromatografía en columna no fue capaz de resolver la mezcla de los isómeros *Z* y *E* obtenidos en cada caso, por lo cual los espectros de RMN <sup>1</sup>H muestran una zona mal resuelta correspondiente a los protones de la región aromática. Las señales correspondientes a los protones de la región alifática pudieron ser distinguidas y asignadas a cada isómero. Una vez asignadas las señales se determinó por medio de la integración observada la razón en la cual se encontraban dichos isómeros en la mezcla obtenida. Para el compuesto **41** se observó que los isómeros *Z:E* se encuentran en una razón de 3:2 y para el compuesto **50** en una proporción de 10:9. En la **Figura 87** y en la **Tabla 32** se detalla la asignación de las señales de los protones no aromáticos para ambos isómeros del compuesto **41**.



**Figura 87.** A la derecha de la figura, segmento de baja frecuencia del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla de isómeros *Z:E* obtenida en la purificación del compuesto **41**. Los números en negro corresponden a los números de las señales que se detallan en la **Tabla 32**; los números en azul; dan cuenta de los desplazamiento químico; y los números en rojos de la integración de cada señal. A la izquierda de la figura se muestran las estructuras de ambos isómeros.

**Tabla 32.** Asignación de señales a baja frecuencia de los componentes de la mezcla isomérica *Z:E* para el compuesto 41.

| Nº señal | $\delta^1\text{H/ ppm}$ | Integración | Multiplicidad | Clasificación                               |
|----------|-------------------------|-------------|---------------|---|
| 1        | 2,90                    | 1,9         | S             | ( <i>Z</i> ) N-CH <sub>3</sub>              |
| 2        | 3,23                    | 1,1         | S             | ( <i>E</i> ) N-CH <sub>3</sub>              |
| 3        | 3,89                    | 1,9         | S             | ( <i>Z</i> ) <i>p</i> -OCH <sub>3</sub>     |
| 4        | 3,90                    | 1,1         | S             | ( <i>E</i> ) <i>p</i> -OCH <sub>3</sub>     |
| 5        | 4,92                    | 1,2         | S             | ( <i>Z</i> ) <i>m</i> -OCH <sub>2</sub> -Ar |
| 6        | 5,18                    | 0,8         | S             | ( <i>E</i> ) <i>m</i> -OCH <sub>2</sub> -Ar |
| 7        | 6,64                    | 0,4         | S             | ( <i>E</i> ) =CH                            |
| 8        | 6,77                    | 0,6         | S             | ( <i>Z</i> ) =CH                            |



**Figura 88.** Compuestos (*Z,E*)-41 y (*Z,E*)-50

En la asignación se observó que los protones correspondientes al *p*-OCH<sub>3</sub> prácticamente no son afectados por el cambio del ambiente químico dado por la isomería *Z* y *E* (0,02 ppm de diferencia). En cambio, el efecto del entorno químico sobre los otros protones es mayor llegando a una diferencia de 0,33 ppm, donde los del grupo N-CH<sub>3</sub> son los más afectados. La posición *para* del segmento proveniente del aldehído en el compuesto 50 nuevamente no es afectada por la isomería, observándose para los protones CH<sub>2</sub> del grupo bencilico (*p*-OCH<sub>2</sub>-Ar) una diferencia de 0,03 ppm entre ambas señales (espectro completo Anexo C, p.228). Según lo anterior, la

proporción isomérica *Z:E* obtenida para el compuesto **41** (3:2) diferente a la obtenida para el compuesto **50** (10:9), puede ser determinada por el efecto estérico que produce el grupo bencilo en la formación del doble enlace.

Una vez obtenidos los dos isómeros de cada derivado en la reacción anterior se procedió a realizar su hidrólisis sin separarlos, modificando la metodología propuesta en la literatura (Takahashi y col., 1983). Las primeras pruebas realizadas con **50** mostraron que 24 horas de hidrólisis ácida (solución 1:1 de HCl al 10% v/v en agua y THF) no eran suficientes para hidrolizar todo el material de partida pero que además, al mantener las condiciones por más tiempo, aparecía un producto secundario de menor polaridad, que presentaba la misma  $R_f$  que el ácido **38a**. Para que la hidrólisis continuara sin afectar la protección se realizó una serie de ciclos hasta no observar un cambio significativo en la masa del ácido aislado. Estos ciclos constaban de mantener las condiciones de reacción por 24 horas, luego extraer el ácido formado y volver a someter la mezcla a las mismas condiciones de reacción. En la **Tabla 33** se encuentran los ciclos de reacción y los rendimientos porcentuales para cada ácido.

**Tabla 33.** Hidrólisis en ciclos consecutivos de las  $\alpha$ -cianoenaminas **41** y **50**.

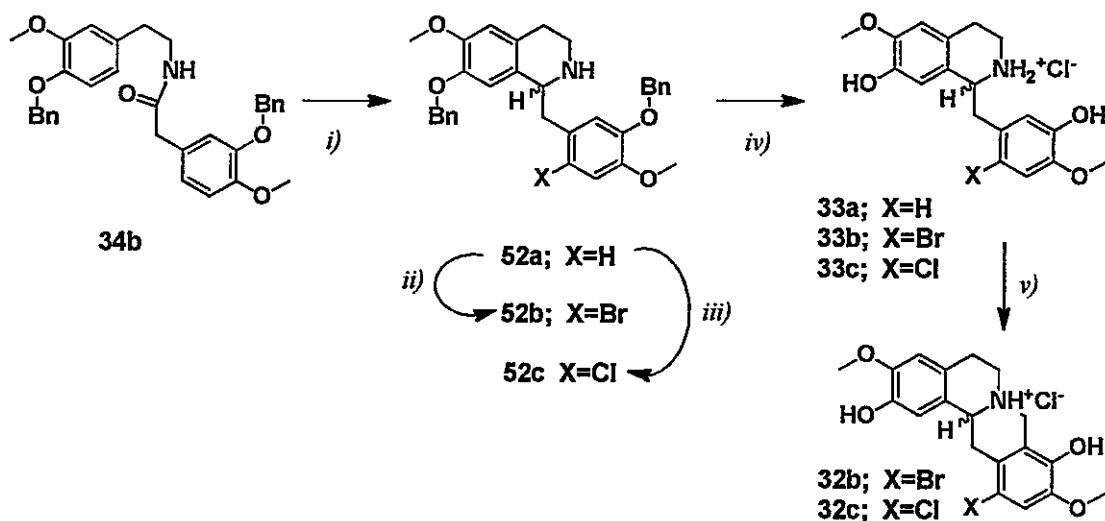
| Ciclo de<br>reacción | Rendimiento porcentual |       |
|----------------------|------------------------|-------|
|                      | 41                     | 50    |
| 1                    | 39,9                   | 65,4  |
| 2                    | 62,1                   | 82,7  |
| 3                    | 73,2                   | 86,7  |
| 4                    | 75,4                   | ----- |

Una vez obtenido el ácido **36b** se procedió a obtener la obtención de la amida **34b** precursora de la BTHIQ, utilizando carbonildiimidazol (CDI) como activador de la función ácida (Metro y col., 2012). Además se evaluó la realización del procedimiento la reacción en presencia de

solvente (THF (Shoupe y col., 1990) y DMF (Aboaraia y col., 2010)) y en ausencia de estos, obteniéndose mejor resultado al utilizar THF debido a la mayor facilidad de la purificación.

*12-bromoescoulerina (32b) y 12-cloroescoulerina (32c)*

Una vez obtenida la amida **34b** se siguió con la ruta sintética propuesta en la literatura con pequeñas modificaciones para la obtención de la 12-bromoescoulerina (**32b**) (Kametani y Ihara, 1967; Kametani y col., 1969). En cuanto a la 12-cloroescoulerina (**32c**), se reemplazó el bromo en ácido acético por cloruro de sulfurilo en ácido trifluoroacético. En la **Figura 89** se esquematiza la ruta sintética comentada.



**Figura 89.** Ruta sintética para la obtención de los derivados halogenados de escoulerina desde **34b**. *i)* 1-. POCl<sub>3</sub>, Benceno, reflujo, 2 h.; 2-. NaBH<sub>4</sub>, MeOH, reflujo, 0,5 h.; *ii)* Br<sub>2</sub>, AcOH, 25 °C; *iii)* SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TFA; *iv)* EtOH:HCl<sub>(0)</sub> (1:1), reflujo, 3 h.; *v)* 1-. H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>CO<sub>(20%)</sub> (1:1), reflujo, 3 h.; 2-. HCl, éter.



Las halogenaciones fueron los pasos sintéticos de menor rendimiento (inferior a 50%). En cuanto a la etapa de formación de los derivados **33** y **32**, en todos los casos se superó el 70% de rendimiento obteniéndose un rendimiento total (partiendo desde la formación de la amida **33b**) de 13% para el clorhidrato de 12-bromoescoulerina y de 10% para el clorhidrato de 12-cloroescoulerina.

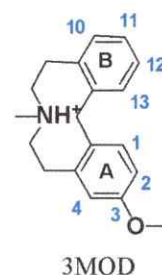
La caracterización realizada por RMN  $^1\text{H}$  mostró que los compuestos **33** y **32** presentan señales de difícil de resolución principalmente en la zona de baja frecuencia. Los compuestos **53** presentan una mejor resolución que posiblemente está dada por un apilamiento de los anillos aromáticos. Según la flexibilidad de ellos es posible que el anillo 5'-*O*-bencilado se posicione sobre el anillo aromático isoquinolínico a pesar de la ausencia de sustituyentes en el nitrógeno. En el caso del derivado **52a** (donde mejor se encuentra resulta la zona de baja frecuencia) este posible conformero explicaría la multiplicidad observada para uno de los  $-\text{CH}_2-$  bencilicos. Los espectros de conformeros similares han sido analizados anteriormente (Iturriaga-Vásquez y col., 2003).

## Conclusiones

La comparación entre las secuencias aminoacídicas de diferentes GPCR (bRh, hD<sub>3</sub>, hβ<sub>2</sub>AR, hA<sub>2</sub>A, hM<sub>2</sub> y hH<sub>1</sub>) con las de los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub>, estableció que el mejor molde cristalográfico disponible para construir un modelo del hD<sub>1</sub> es el receptor hβ<sub>2</sub>AR y para el hD<sub>2</sub> es el hD<sub>3</sub>. Los modelos de los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> construidos sobre estos patrones presentaron más de 90% de sus residuos con estereoquímica correcta y conservaron el sitio de interacción propuesto para la unión de monoaminas endógenas y ligandos sintéticos.

Los sitios ortoestéricos de ambos RD se diferencian por las características fisicoquímicas de los residuos ubicados en el e<sub>2</sub>, el extremo extracelular de las TM V y TM VII. Estas diferencias pueden ser responsables de generar interacciones que condicionan las afinidades de moléculas que muestran selectividad entre el hD<sub>1</sub> y el hD<sub>2</sub>. Un modelo del hD<sub>1</sub> con dos puentes de disulfuro ubicados hacia el espacio extracelular, evaluado en ausencia de ligando, mostró que el segundo puente de disulfuro ubicado en e<sub>3</sub> evita la formación del puente salino entre los residuos R3.50-E6.30 característico del estado inactivo.

La simulación molecular mostró que el antagonista 3MOD se aloja en el sitio propuesto y que la posición que adopta en este bolsillo es estable en el tiempo. El grupo amonio interacciona con el anión del D3.32; el anillo



A de 3MOD se direcciona hacia el interior del receptor rodeado por una cavidad hidrofílica hacia cuyas serinas (en la TM V) se orienta el grupo metoxilo, aunque sin una interacción evidente; el anillo B se posiciona hacia el espacio extracelular quedando rodeado de residuos de diferentes características.

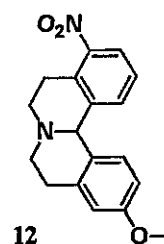
Según las posibilidades de síntesis de derivados de 3MOD y las características de los residuos aminoácidos que conforman el bolsillo del receptor, se propuso sustituir los átomos C-4, C-10 y C-11 por la inclusión de: halógenos en C-4 y grupos  $-NH_2$  y  $-CH_2NH_2$  en C-10 o C-11.

Las  $K_i$  obtenidas para 4-cloro3MOD y 4-bromo3MOD reflejaron que la introducción de un halógeno y el aumento de su tamaño mejora la selectividad por el  $hD_1$  sobre el  $hD_2$ . Comparando estos resultados con un estudio por simulación molecular de la aporfina dopaminérgica boldina y sus 3-halogenoderivados se visualizó que las técnicas utilizadas reconocen un efecto del halógeno en la variación de la  $K_i$ , pero no muestran si este efecto se debe o no a una interacción de puente de halógeno.

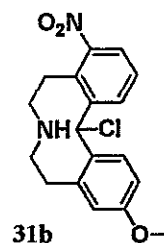
Los resultados de simulación molecular permiten proponer que las diferencias en las afinidades entre 3MOD y cada uno de sus derivados halogenados en el C-4 son debidos a interacciones con un residuo polar (S3.36 en  $hD_1$  y C3.36 en  $hD_2$ ), el cual podría establecer un puente de halógeno y/o de hidrógeno con el halógeno presente en el ligando.

El estudio por simulación molecular de las modificaciones en el C-10 y en el C-11 permitió proponer que la incorporación de grupos aromáticos aumentaría la afinidad en ambos receptores y que la incorporación en C-10 de grupos electrón-atractores, tales como sulfamidas, aumentarían selectivamente la afinidad en el hD<sub>1</sub> por sobre el hD<sub>2</sub>.

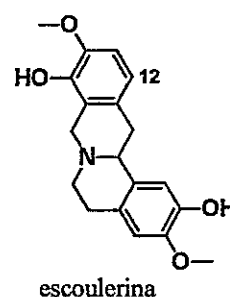
Un intento de síntesis de la 3MOD modificada en el anillo B mostró que la presencia de un grupo nitro en C-10 en la amina tetracíclica precursora (**12**) cambia el mecanismo de la reacción de apertura del biciclo alifático, obteniéndose una especie química inesperada (14-cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-



hexahidrodibenz[*d,g*]acecina(**31b**)) en las mismas condiciones de reacción utilizadas para la obtención de la 3MOD.



Continuando con el objetivo de estudiar el posible papel de puentes en la afinidad de ligandos por hD<sub>1</sub> se sintetizó y evaluó la afinidad de 12-cloroescoulerina y 12-bromoescoulerina. La presencia de cloro en el C-12 aumentó la afinidad por el hD<sub>1</sub> de acuerdo a lo esperado.



### ***Conclusión General***

El estudio de las características estructurales de los receptores dopaminérgicos por medio de técnicas de simulación molecular, permitió proponer nuevos ligandos basados en la estructura del antagonista 3MOD e interpretar las afinidades determinadas para algunas de las moléculas sintetizadas a través de las potenciales interacciones específicas con los diferentes residuos aminoacídicos presentes en los receptores. Al no lograr la síntesis de derivados con grupos metilo o etilo en las posiciones correspondientes no fue posible asegurar si el papel del cloro o el bromo involucra la formación de una interacción dipolar por puente de halógeno o de hidrógeno o si se trata meramente de una interacción hidrofóbica.

## Metodología

### SIMULACIÓN MOLECULAR

#### *Estudio de interacciones proteína-ligando mediante metodologías de simulación molecular*

Los receptores de dopamina denominados  $D_1$  y  $D_2$  son los que presentan una mayor densidad dentro del sistema nervioso central. Debido a ello, es que se han transformado en importantes blancos terapéuticos. Considerando que la descripción tridimensional de estas macromoléculas nos permitirá conocer más detalles de las interacciones que se generan con ligandos endo- y exógenos se modela el  $hD_1$  y el  $hD_2$ . La construcción de estos modelos se realizó por medio de modelamiento por homología utilizando como patrones estructuras cristalinas de receptores relacionados y el programa Modeller que considera, para generar el modelo, restricciones espaciales de la estructura molde, como también de otras estructuras cristalinas de proteínas presentes en su base de datos (Šali y Blundell, 1993; Fiser y col., 2000; Martí-Renom y col., 2000; Eswar y col., 2006).

#### • *Modelado por homología. Construcción y validación de los modelos de $hD_1$ y $hD_2$ .*

El alineamiento aminoacídico se realizó a través de: el programa gratuito Jalview (Waterhouse y col., 2009) y por refinado a mano. En esta etapa se utilizó la secuencia aminoacídica de cada estructura a modelar y las secuencias de las proteínas moldes. En nuestro caso se realizó un alineamiento múltiple con la finalidad de establecer las zonas conservadas entre las estructuras de interés y los moldes. La elección del molde se encuentra determinado por el porcentaje de identidad aminoacídica obtenido por comparación entre los candidatos, mientras mayor sea

mejor será el molde. La secuencia aminoacídica del hD<sub>1</sub> y del hD<sub>2</sub> fue obtenida de la base de datos Uniprot. ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) donde los códigos respectivos son: P21728 y P14416. Las estructuras cristalinas de los candidatos que se utilizaron fueron: bRh, hD<sub>3</sub>, hβ<sub>2</sub>AR, hA<sub>2</sub>A, hM<sub>2</sub> y hH<sub>1</sub> humanas como también de tβ<sub>1</sub>AR. Ellas se obtuvieron de la base de datos RSCB Protein Data Bank ([www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)) y sus códigos PDB respectivos son: 1F88 (Palczewski y col., 2000), 3PBL (Chien y col., 2010), 2RH1 (Rasmussen y col., 2007), 3EML (Jaakola y col., 2008), 3UON (Haga y col., 2012), 3RZE (Shimamura y col., 2011) y 2Y01 (Huang y col., 2013).

Para la construcción de los modelos de los receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> se utilizó el programa MODELLER 9 (Shen y Sali, 2006; Melo y Sali, 2007). Fueron creados 100 modelos para cada receptor escogiendo los mejores 5. La discriminación consideró los valores de DOPEscore entregados por el mismo programa. Para diferenciar el mejor de los 5 modelos se realizó una evaluación estereoquímica (obtención de las representaciones de Ramachandran) de forma “online” a través de PDBsum ([www.ebi.ac.uk/pdbsum/](http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/)) (Laskowski y col., 1997). Finalmente la calidad total y local del modelo escogido para ambos receptores fue evaluada y comparada con los moldes por medio del sitio web ProSa ([prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php](http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php)) (Sippl, 1993; Wiederstein y Sippl, 2007). En la construcción de los modelos se incorporó un puente disulfuro en ambos modelos definido entre C3.25 y C186e\_2 en el hD<sub>1</sub> y entre C3.25 y C182e\_2 en el hD<sub>2</sub>.

- *Estudio de interacciones Proteína-ligando. Parametrización de los ligandos, acoplamiento y dinámica molecular.*

Las estructuras de cada ligando fueron construidas y optimizadas energéticamente a través del programa Wavefunction Spartan 8.0. El nivel de teoría utilizado fue de DFT y el conjunto de bases B3LYP/6-31G\*\*.

Para obtener los archivos de topología (\*.rtf) y parámetros (\*.prm) de cada ligando estudiado por dinámica molécula se utilizó el sitio web SwissParam ([www.swissparam.ch](http://www.swissparam.ch)) (Zoete y col., 2011).

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron utilizando principalmente el programa AutoDock 4.2 (Morris y col., 2009) y en el caso del estudio de las moléculas halogenadas se utilizó además el programa Dock 6 (Lang y col., 2009; Mukherjee y col., 2010).

En el programa AutoDock 4.2 el volumen escogido para los mapas de grillas fue de 70 x 70 x 64 puntos para el hD<sub>1</sub> y 70 x 70 x 60 puntos para el hD<sub>2</sub>, donde cada punto de grilla se encuentra espaciado por 0,375 Å. El acoplamiento molecular se desarrolló utilizando Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) y las siguientes condiciones: poblaciones igual a 100, en cada población un número de individuos igual a 1500, número máximo de evaluaciones de energía de 25.000.000 y número máximo de generaciones 27.000.

En el programa Dock 6 se utilizaron los parámetros sugeridos por el fabricante en la sección "ligand\_samplig\_demo". Como punto de referencia para la generación de la grilla se consideró



la posición de menor energía de boldina obtenida por el programa AutoDock 4 y un espacio de evaluación entre punto y punto de 0,25 Å. En el acoplamiento molecular se estableció en 500 el número máximo de orientaciones posibles.

El sistema para la realización de dinámica molecular fue preparado a través del programa VMD 1.9 (Humphrey y col., 1996). Por éste medio se construyó alrededor de los modelos del hD<sub>1</sub> y del hD<sub>2</sub> una bicapa lipídica de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatilcolina (POPC) de 100 Å<sup>2</sup> y se incluyó la cantidad de solvente suficiente que cubriera totalmente el segmento intracelular y extracelular. El sistema final presentó una dimensión total de 96x96x120 Å para el hD<sub>1</sub> y una dimensión de 96x96x99 Å para el hD<sub>2</sub>. Con el fin de simular las condiciones de salinidad utilizados en los experimentos *in vitro* se incluyó iones Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> con una concentración de 50 mM para el hD<sub>1</sub> y de 100 mM para el hD<sub>2</sub>.

Cada sistema fue inicialmente minimizado 10000 pasos (20ps) y luego equilibrado por 20ns a una temperatura de 310K. Ambos pasos fueron realizados a través del programa NAMD 2,9 (Phillips y col., 2005).

## Metodología

### SÍNTESIS ORGÁNICA

**Isocroman-1-ona (5).** A 8,4 mmol de isocromano (1,13 g; 1,06 mL) disuelto en 120 mL de DCM, se le agregó 19,2 g de oxidante (mezcla en partes iguales en peso de  $\text{KMnO}_4$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  finamente divididos). Luego la mezcla se sometió a radiación de ultrasonido en un equipo convencional de radiación continua (Fisher scientific FS20H, 115 volt, 50/60 Hz) hasta corroborar por medio de CCF que el avance de la reacción se había detenido (5 h). Luego la mezcla heterogénea fue filtrada con Celite® y lavada con DCM (3x40 mL) o éter etílico en la ausencia del primero; las fases orgánicas fueron concentradas por evaporación a presión reducida. El aceite obtenido fue purificado por medio de cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de polaridad ascendente (de 0% a 30%) de AcOEt-hexano, obteniéndose 0,88 g (75%) de **5** como un aceite translúcido. RMN  $^1\text{H}$  de baja resolución (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.96 – 7.98 (br. s, 1 H, Ar-H) 7.39 – 7.43 (br. s, 1 H, Ar-H) 7.27 – 7.29 (br. s, 1 H, Ar-H) 7.15 (br. s, 1 H, Ar-H) 4.14 – 4.43 (m, 2 H, O- $\text{CH}_2$ -) 2.94 – 2.97 (m, 2 H, Ar- $\text{CH}_2$ -). Anexo C, p. 211.

**2-(2-Hidroxietil)-N-(3-metoxifeniletíl)benzamida (7).** Se hicieron reaccionar 1 eq. de **5** (2,06 g; 13,87 mmol) y 1 eq. de 3-metoxifeniletílamina (2,97 g; 2,02 mL; 13,87 mmol) a 120 °C por 24 horas. Luego el aceite marrón obtenido se purificó a través de cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt-hexano en gradiente (30% a 80%), obteniéndose 3,65 g (88%) de **7** como un aceite amarillo que con el tiempo precipitó. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.36 – 7.45 (m, 1 H, Ar-H) 7.30 – 7.36 (m, 1 H, Ar-H) 7.27 – 7.30 (m, 1 H, Ar-H) 7.19 – 7.26 (m, 2 H, Ar-H) 6.77 – 6.82 (m, 3 H, Ar-H) 6.38 (br. s, 1 H, NH) 3.88 (t,  $J=5.8$  Hz, 2

H, HO-CH<sub>2</sub>) 3.81 (s, 3 H, Ar-OCH<sub>3</sub>) 3.69 – 3.78 (m, 2 H, N-CH<sub>2</sub>) 2.87 – 3.98 (m, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 211.

**3-Metoxi-6,8,9,13 b-tetrahidro-5H-isoquinolino[1,2-a]isoquinolina (8).** 3 mmol de 7 (0,90 g), se disolvieron en 20 mL de POCl<sub>3</sub> y se dejaron a 120 °C durante 10 h. Una vez transcurrido este tiempo y fría la mezcla de reacción, se le agregó 50 mL de hexano con agitación vigorosa. Luego la mezcla se dejó en reposo por 5 h y se retiró el sobrenadante quedando un aceite oscuro en el fondo del balón. El residuo se lavó con hexano (3x20 mL) y posteriormente se disolvió en 60 mL de MeOH. La nueva mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y agua y se le agregó 3 g de NaBH<sub>4</sub> en pequeñas porciones. Una vez finalizado el agregado del reductor se llevó la mezcla a temperatura de reflujo por 30 min. Luego se eliminó el solvente por destilación a presión reducida, el precipitado formado se disolvió en una pequeña cantidad de agua y se realizó una extracción con DCM. La fase orgánica se secó, se concentró y se purificó a través de cromatografía en columna. Para esto último se utilizó como eluyente una mezcla de AcOEt-MeOH 99:1 obteniéndose 0,52 g (65%) de 8 como un aceite amarillo que después de un tiempo se solidificó. RMN <sup>1</sup>H de baja resolución (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7.13 (m, 4 H, Ar-H) 7.04 – 7.06 (m, 1 H, Ar-H) 6.70 (m, 2 H, Ar-H) 4.96 (s, 1 H, -CH) 3.71 (m, 3 H, Ar-OCH<sub>3</sub>) 2.67 – 3.17 (m, 8 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 212.

**3-Metoxi-5,6,8,9-tetrahidrodibenz[*d,g*]acecina-7(14H)-carboxilato de etilo (9).** A una solución 0,05 M de 8 (1,32 g; 5 mmol) en THF seco, enfriada a -65 °C (baño de hielo seco/MeOH) en atmósfera inerte, se le agregó un exceso de ClCO<sub>2</sub>Et (3 mL; 31 mmol) continuando la reacción a la misma temperatura por 4 h. Luego, siempre a -65 °C, se le agregó lentamente una solución 1 M de NaCNBH<sub>4</sub> (1,09 g; 17 mmol) en THF seco (17 mL) y la mezcla de reacción se dejó toda la noche alcanzando temperatura ambiente. La mezcla subsecuentemente se trató con una solución 2 M de NaOH (220 mL), se separó la fase orgánica y esta se lavó con salmuera y, finalmente el solvente se eliminó obteniéndose un aceite amarillo.

La purificación del residuo se realizó a través de cromatografía en columna utilizando una mezcla en gradiente 20% a 40% de AcOEt-hexano, obteniéndose 1,38 g (81%) del compuesto **9** como un aceite translúcido. RMN  $^1\text{H}$  de baja resolución (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.10 – 7.29 (m, 5 H, Ar-H) 6.65 – 6.75 (m, 2 H, Ar-H) 4.04 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2$ -Ar) 3.82 (m, 5 H, - $\text{OCH}_3$  y  $\text{CO}_2$ - $\text{CH}_2$ ) 3.60 (br. s, 2 H, - $\text{CH}_2$ -) 3.46 (br. s, 2 H, - $\text{CH}_2$ -) 2.99 (br. s, 2 H, - $\text{CH}_2$ -) 2.40 (br. s, 2 H, - $\text{CH}_2$ -) 0.87 (m, 3 H, - $\text{CH}_3$ ). Anexo C, p. 213.

**3-Metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (3a).** A una solución 1 M del compuesto **9** (1,37 g; 4,05 mmol) en THF seco enfriada a 0 °C en atmósfera inerte se le agregó lentamente una suspensión de  $\text{LiAlH}_4$  (0,6 g; 15,8 mmol) en THF seco (150 mL). Una vez completa la adición, la mezcla se calentó bajo a reflujo por 2 h. Pasado este tiempo la mezcla se enfrió y se trató cuidadosamente con una solución al 25% de tartrato de sodio y potasio hasta que no se observó liberación de  $\text{H}_2$ . La suspensión resultante se filtró, se lavó con éter etílico y se concentró bajo presión reducida, obteniéndose 1,06 g (91%) del compuesto **3a**. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.05 – 7.34 (m, 5 H, Ar-H) 6.63 – 6.76 (m, 2 H, Ar-H) 4.40 (s, 2 H, - $\text{CH}_2$ -) 3.79 (s, 3 H, - $\text{OCH}_3$ ) 2.66 – 2.79 (m, 8 H) 2.30 (s, 3 H, N- $\text{CH}_3$ ). Anexo C, p. 213.

**4-Cloro-3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (3b).** A una solución 0,1 M del compuesto **7** (81,5 mg; 0,29 mmol) en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  se le agregó 1 eq. de  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (39,1 mg; 0,29 mmol; 0,024 mL) a temperatura ambiente. La reacción se detuvo una vez transcurridas 2,5 h añadiendo gota a gota un solución 5 M de NaOH. Una vez alcanzado pH 9 se realizó una extracción con AcOEt (3x15 mL), luego la fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se concentró. La purificación del residuo se realizó a través de cromatografía en columna utilizando una mezcla AcOEt-hexano en gradiente 20% a 100%, para dar 41,2 mg (46%) del compuesto **3b**. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )  $\delta$  ppm 7.28 – 7.31(m, 1 H, Ar-H) 7.20 (d,  $J=8.7$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.06 – 7.12 (m, 3 H, Ar-H) 6.83 (d,  $J=8.7$  Hz, 1 H, Ar-H) 4.26 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2$ -Ar) 3.81 (s, 3 H, Ar- $\text{OCH}_3$ ) 3.01 – 3.04 (t, 2 H, - $\text{CH}_2$ -) 2.74 – 2.29 (m, 6 H, - $\text{CH}_2$ -) 2.24 (s, 3 H, N- $\text{CH}_3$ ). Anexo C, p.

214.

**4-Bromo-3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[d,g]acecina (3c).** A una solución 0,2 M de **7** (151,5 mg; 0,53 mmol) en  $\text{CF}_3\text{COOH}$  se le agregó 1 eq. de NBS (94,3 mg; 0,53 mmol) a 0 °C. La reacción se detuvo una vez transcurridas 2,5 h con un solución 5 M de NaOH la cual fue agregada gota a gota hasta alcanzar pH 9. Posteriormente se realizó una extracción con AcOEt (3x15 mL) y, luego la fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se concentró. La purificación del residuo se realizó a través de cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt-hexano en gradiente 20% a 100%, obteniéndose 69,3 mg (36%) del compuesto **3c**. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )  $\delta$  ppm 7.25 – 7.28 (m, 1 H, Ar-H) 7.22 (d,  $J=8.6$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.04 – 7.10 (m, 3 H, Ar-H) 6.77 (d,  $J=8.6$  Hz, 1 H, Ar-H) 4.26 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2$ -Ar) 3.77 (s, 3 H, Ar-O $\text{CH}_3$ ) 3.03 – 3.08 (t, 2 H, - $\text{CH}_2$ -) 2.68–2.75 (m, 6 H, - $\text{CH}_2$ -) 2.23 (s, 3 H, N- $\text{CH}_3$ ). Anexo C, p. 214.

**2-Metil-3-nitrobenzoato de metilo (27).** A una solución 1 M de **26** (1g; 5,6 mmol) en MeOH (5,6 mL) se le agregó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado como catalizador. La mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo por 24 h. Luego de enfriar la mezcla se eliminó el solvente y se realizó una purificación por medio de extracciones ácido/base obteniéndose el compuesto **27** con un rendimiento de 82%. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.00 (dd,  $J=7.8, 1.2$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.85 (dd,  $J=8.1, 1.2$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.33 – 7.48 (m, 1 H, Ar-H) 3.95 (s, 3 H,  $\text{CO}_2\text{-CH}_3$ ) 2.63 (s, 3 H, Ar- $\text{CH}_3$ ). Anexo C, p. 215.

**2-(2-(Dimetilamino)vinil)-3-nitrobenzoato de metilo (28).** A una solución 1 M de **27** (6 g, 30,8 mmol) en DMF seco se le agregaron 4 eq. de dimetilacetal de dimetilformamida (DMFDMA, 14,7 g; 17,14 mL; 123 mmol). La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo por 16 h, luego se enfrió y se eliminó el solvente. Posteriormente, a modo de purificación, se realizó una destilación a presión reducida (260 °C y 8 Torr) obteniéndose como producto un aceite rojizo oscuro con un rendimiento de 75%. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.69 (m, 2 H, Ar-H)

7.07 (t,  $J=7.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 6.32 (d,  $J=13.7$  Hz, 1 H, Ar-CH=) 5.64 (d,  $J=13.7$  Hz, 1 H, N-CH=) 3.85 (s, 3 H, CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) 2.81 (s, 6 H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Anexo C, p. 215.

**5-Nitro-1*H*-isocromen-1-ona (29).** Una solución 0,1 M de **28** (4,4 g; 23 mmol) en AcOEt se agregó sobre gel de sílice (SiO<sub>2</sub>, 300 g). Una vez homogenizadas ambas fases se dejó la mezcla de reacción a temperatura ambiente por 1 h con agitación vigorosa. Para extraer **29** de la mezcla de reacción se realizaron lavados sucesivos de la fase sólida con DCM. La purificación se realizó a través de cromatografía en columna utilizando una mezcla 1:1 de AcOEt-hexano, obteniéndose 2,1 g (48%) del compuesto **29**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.64 (dd,  $J=7.8, 1.5$  Hz, 1 H, Ar-H) 8.43 – 8.55 (m, 1 H, Ar-H) 7.68 (t,  $J=8.1$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.41 – 7.50 (d,  $J=6.4$  Hz, 1 H, Ar-CH=) 7.35 – 7.41 (d,  $J=6.4$  Hz, 1 H, O-CH). Anexo C, p. 216.

**2-[2-(3-Metoxifenil)etil]-5-nitroisoquinolin-1(2*H*)-ona (30).** A 1 eq. de **29** (224 mg; 1,17 mmol) se le agregó 1 eq. de 3-metoxifeniletilamina (176 mg; 170 μL; 1,17 mmol) y se dejaron reaccionar por 24 h a 120 °C. La purificación se realizó a través de cromatografía en columna utilizando DCM como fase móvil obteniéndose 366 mg (83%) del compuesto **30**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.79 (d,  $J=7.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 8.40 (d,  $J=7.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.56 (t,  $J=8.1$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.21 (t,  $J=7.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.16 (d,  $J=7.8$  Hz, 1 H, Ar-CH=) 6.98 (d,  $J=7.8$  Hz, 1 H, N-CH=) 6.78 (m, 2 H, Ar-H) 6.73 (s, 1 H, Ar-H) 4.24 (t,  $J=7.3$  Hz, 2 H Ar-CH<sub>2</sub>) 3.74 – 3.79 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.08 (t,  $J=7.3$  Hz, 2 H, N-CH<sub>2</sub>) Anexo C, p. 7. RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 160.8, 160.2, 144.9, 139.5, 135.9, 134.6, 131.2, 130.1, 129.6, 128.4, 125.9, 121.5, 114.9, 112.5, 100.4, 77.6, 77.3, 55.4, 51.9, 35.3. Anexo C, p. 218.

**3-Metoxi-10-nitro-6,8 b-dihidro-5*H*-isoquinolino[1,2-*a*]isoquinolina (12).** El compuesto **12** se sintetizó mediante la metodología empleada para **5** obteniéndose un rendimiento de 31%. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.83 (d,  $J=7.4$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.48 (d,  $J=7.4$  Hz, 1 H, Ar-H) 7.32 (t,  $J=7.9$  Hz, Ar-H) 6.98 (d,  $J=8.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 6.66 – 6.77 (m, 2H, Ar-H) 5.12 (s, 1 H, Ar-CH-Ar) 3.80 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 2.77 – 3.35 (m, 8 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 218.

**14-Cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (31b).** El compuesto **31b** se sintetizó mediante la metodología empleada para **9** con modificaciones en la etapa de purificación. Esta se realizó a través de cromatografía en columna "flash" utilizando una mezcla de AcOEt-hexano 1:1, obteniéndose 1,8 g (87%) del compuesto **31b** como un aceite translúcido. **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.04 (d, *J*=7.8 Hz, 1 H, Ar-H) 7.38 - 7.59 (m, 2 H, Ar-H) 6.65 - 6.85 (m, 3 H, Ar-H) 5.24 (s, 1 H, Ar-CH-Ar) 3.81 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.70 - 3.86 (m, 1 H, -CH<sub>2</sub>-) 2.96 - 3.64 (m, 7 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 9. **RMN <sup>13</sup>C** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 159.7, 148.6, 135.4, 134.3, 133.6, 129.8, 128.1, 127.1, 124.9, 124.1, 113.5, 113.1, 77.3, 77.0, 76.7, 64.7, 56.2, 55.4, 51.1, 25.1, 23.2. Anexo C, p. 219.

**4-Benciloxi-3-metoxibenzaldehído (37b).** A una solución 0,5 M de 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído (**37a**; 10,05g; 66 mmol) en EtOH se le añadió 1,1 eq. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10,00 g; 72 mmol) y 1,25 eq. de cloruro de bencilo (10,36 g; 11,4 mL; 81,9 mmol) gota a gota. Una vez terminada la incorporación del reactivo se calentó hasta temperatura de reflujo. Cuando se observó por CCF la desaparición del compuesto **37a**, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró. Posteriormente el precipitado obtenido se lavó con dos porciones de EtOH. La fase orgánica se concentró y recristalizó con EtOH obteniéndose 14,1 g (88%) del compuesto **37b** como cristales amarillos pálidos. **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 9.84 (s, 1 H, CHO) 7.43 - 7.49 (m, 4 H, Ar-H) 7.37 - 7.40 (m, 1 H, Ar-H) 7.35 - 7.38 (m, 1 H, Ar-H) 7.32 (d, *J*=6.8 Hz, 1 H, Ar-H) 6.99 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H, Ar-H) 5.20 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 3.84 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>). Anexo C, p. 221.

**1-Benciloxi-2-metoxi-4-(2-nitrovinil)benceno (38).** A 6 eq. de nitrometano (6,33 g; 7,2 mL; 100 mmol) se le agregó inicialmente 1,8 eq. de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> (2,28 g; 29,6 mmol), en segundo lugar 13,8 eq. de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (13,7 g; 14,4 mL; 228mmol) y finalmente 1 eq. de **37b** (4,0 g; 16,5 mmol). Una vez que se terminó la incorporación de los reactivos, la reacción se calentó a reflujo por 2 horas. Posteriormente la mezcla se enfrió y se le agregó una pequeña cantidad de MeOH,

luego el precipitado formado se filtró, se lavó con MeOH frío y se secó obteniéndose 4,14 g (88%) del compuesto **14** como un precipitado amarillo intenso. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.22 (d,  $J=13.2$  Hz, 1 H,  $\text{NO}_2\text{-CH}$ ) 8.06 (d,  $J=13.2$  Hz, 1 H, Ar-CH) 7.52 (s, 1 H, Ar-H) 7.25 - 7.49 (m, 6 H, Ar-H) 7.14 (d,  $J=8.31$  Hz, 1 H, Ar-H) 5.18 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$ ) 3.84 (s, 3 H, ArO- $\text{CH}_3$ ). Anexo C, p. 222.

**2-(4-Benciloxi-3-metoxifenil)etilamina (35b)**. A una suspensión de 5 eq. de  $\text{LiAlH}_4$  (3,6 g; 96,4 mmol) en THF seco (193 mL) se le agregó 1 eq. del compuesto **38** (5,5 g; 19,3 mmol) en pequeñas porciones. Posteriormente la mezcla se calentó hasta temperatura de reflujo por 24 h. Para eliminar el reductor sobrante, la mezcla se enfrió y se trató con gotas de una solución saturada de tartrato de sodio y potasio hasta que no se observó desprendimiento de gas. Posteriormente el precipitado obtenido se filtró y se lavó con THF, luego la fase orgánica se concentró al vacío hasta sequedad obteniéndose 4,45 g (89%) del compuesto **35b** impuro. El aceite obtenido se purificó por destilación a presión reducida (210 °C, 7 Torr) obteniéndose 2,2 g (44%) del compuesto **35b** como un aceite translúcido. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8.09 (br. s., 2 H,  $\text{NH}_2^+$ ) 7.24 - 7.49 (m, 6 H, Ar-H) 6.97 (d,  $J=7.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 6.91 (s, 1 H, Ar-H) 6.74 (d,  $J=7.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 5.06 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$ ) 3.79 (s, 3 H, ArO- $\text{CH}_3$ ) 3.00 (t,  $J=7.8$  Hz, 2 H, N- $\text{CH}_2$ ) 2.84 (t,  $J=7.8$  Hz, 2 H, Ar- $\text{CH}_2$ ). Anexo C, p. 222.

**4-(Hidroximetil)-2-metoxifenol (42a)**. A una solución 0,5 M de **37a** (10,05 g; 66 mmol) en MeOH se le agregó 1,5 eq. de  $\text{NaBH}_4$  (3,75g; 99 mmol) en pequeñas porciones a temperatura ambiente. Una vez observado por CCF que el compuesto **37a** había desaparecido a la solución se le agregó gota a gota una solución 5 M de NaOH hasta que no se observó desprendimiento de gas. Posteriormente se evaporó el solvente, el precipitado se disolvió en una solución 0,1 M de HCl y se realizó una extracción con AcOEt (3x50 mL), la fase orgánica se secó y se concentró obteniéndose 8,13 g (80%) del compuesto **42a**. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm d 8.78 (s, 1 H, ArO-H) 6.87 (s, 1 H, Ar-H) 6.63 - 6.75 (m, 2 H, Ar-H) 4.99 (s, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ) 4.36 (d,



$J=5.2$  Hz, 2 H,  $-\text{CH}_2-$ ) 3.74 (s, 3 H, ArO- $\text{CH}_3$ ). Anexo C, p. 223.

**2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)acetonitrilo (43a).** A una solución 0,35 M del compuesto **42a** (15,24 g; 98,9 mmol) en DMF (280 mL) se le agregó 1.2 eq. de NaCN (5,88 g; 120 mmol) y se temperó a 130 °C por 20 h. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó el solvente y se realizó una extracción con AcOEt (3x50 mL), luego la fase orgánica se secó y se concentró. La purificación del residuo se realizó a través de cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt-hexano 1:1, obteniéndose 5,51 g (34%) del compuesto **43a**. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 3.43 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2$ ) 3.74 (s, 3 H, ArO- $\text{CH}_3$ ) 6.63 – 6.65 (d, 1 H, Ar-H) 6.69 – 6.71 (d, 1 H, Ar-H) 6.81(s, 1 H, Ar-H). Anexo C, p. 13. IR-FT:  $-\text{C}\equiv\text{N}$ ; 2257  $\text{cm}^{-1}$ . Anexo C, p. 224.

**Ácido 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acético (44a).** A 100 mL de una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}$  y EtOH (1:1,2) se le añadió 1 eq. del compuesto **16** (5,51g; 33,8mmol) y 4,3 eq. de KOH (8,26 g; 0,147 mmol) y se mantuvo a temperatura de reflujo por 12 h. Una vez transcurrido el tiempo la mezcla de reacción se enfrió y se eliminó el EtOH, luego el residuo restante se acidificó con HCl diluido, se enfrió a 0 °C y el precipitado formado se filtró. A modo de purificación se disolvió el compuesto en AcOEt y se lavó con una solución tampón de fosfato. Una vez seco el compuesto se obtuvo 3,86 g (63%) del compuesto **10**. RMN  $^1\text{H}$  en DMSO- $d_6$  fue idéntico al informado por ACD-A: Sigma-Aldrich.

**2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil) acetato de etilo (47a).** A una solución 0,1 M de **44a** (1,0 g; 5,5 mmol) en EtOH se le agregó unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura de reflujo hasta que la CCF mostró desaparición del compuesto inicial. Posteriormente se eliminó el solvente, se realizó una extracción con AcOEt (3x15 mL), la fase orgánica se secó y se concentró obteniéndose 1,13 g (98%) del compuesto **47a**. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 6.84 – 6.90 (d, 1 H,  $J=8.0$  Hz, Ar-H) 6.82 (sd, 1 H,  $J=1.9$  Hz, Ar-H) 6.77 (dd, 1 H,  $J=8.0, 1.9$  Hz, Ar-H) 5.65 (s, 1 H, Ar-OH) 4.12 – 4.17 (m, 2 H, O- $\text{CH}_2-$ ) 3.88 (s, 3

H, Ar-OCH<sub>3</sub>) 3.54 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>) 1.24–1.27 (t, 3 H, -CH<sub>3</sub>). Anexo C, p. 224.

**2-(4-((2-Metoxietoxi)-metoxi))-3-metoxifenil)acetato de etilo (47c).** A una solución 0,1 M de **47a** (4,03 g; 19,2 mmol) en DCM seco se le agregaron 2 eq. de DIPEA (6,7 mL; 4,9 g; 38,4 mmol), 10 % eq. mol de DMAP (400 mg) y 2 eq. de cloruro de 2-metoxietoximetilo. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 48 h. Una vez transcurrido el tiempo se agregó una pequeña porción de agua para eliminar el agente protector, se agregó una solución 0,1 M de NaOH y se extrajo la fase orgánica con DCM. El extracto orgánico fue concentrado y sometido a una purificación por medio de cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt-hexano 1:9, obteniéndose 3,72 g (65 %) del compuesto **47c**. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.13 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H, Ar-H) 6.83 (s, 1 H, Ar-H) 6.79 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H, Ar-H) 5.29 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>-O) 4.14 (q, *J*=7.1 Hz, 2 H, CO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) 3.80 – 3.93 (m, 5 H, Ar-OCH<sub>3</sub>, O-CH<sub>2</sub>-) 3.49– 3.65 (m, 4 H, O-CH<sub>2</sub>-, Ar-CH<sub>2</sub>) 3.36 (s, 3 H, O-CH<sub>3</sub>). Anexo C, p. 225.

**2-(4-Etoximetoxi-3-metoxifenil)acetato de etilo (47d).** El compuesto **47d** se sintetizó mediante la metodología empleada para **47c** obteniéndose un rendimiento de 73%. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.11 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H, Ar-H) 6.84 (s, 1 H, Ar-H) 6.79 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H, Ar-H) 5.25 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>-O) 4.15 (q, *J*=7,1 Hz, 2 H, CO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) 3.87 (s, 3 H) 3.76 (q, *J*=7.1 Hz, 2 H, O-CH<sub>2</sub>-) 3.55 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>). Anexo C, p. 225.

**2-(2-Bromo-4-etoximetoxi-5-metoxifenil)acetato de etilo (48db).** A una solución 0,1 M de **47d** (3,06 g; 11,4 mmol) en CHCl<sub>3</sub> se le agregaron 13 g de gel de sílice y 1,1 eq. de NBS (2,54 g; 14,3 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente por 20 h con agitación vigorosa. Luego el sólido fue filtrado y la fase orgánica lavada con una solución acuosa al 10% de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (3 x 50 mL) y con salmuera, luego fue secada sobre MgSO<sub>4</sub> y evaporado el solvente a presión reducida. La purificación se realizó por medio de cromatografía en columna flash utilizando una mezcla de AcOEt-hexano 1:4, obteniéndose un 3,2 g (75%) del compuesto **48db**. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.36 (s, 1 H, Ar-H) 6.82 (s, 1 H, Ar-H)

5.24 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>-O) 4.18 (q,  $J=7.1$  Hz, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 3.85 (s, 3 H, Ar-OCH<sub>3</sub>) 3.75 (q,  $J=7.1$  Hz, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 3.70 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>) 1.27 (t,  $J=7.1$  Hz, 3 H, -CH<sub>3</sub>) 1.23 (t,  $J=7.1$  Hz, 3 H, -CH<sub>3</sub>). Anexo C, p. 226.

**3-Benciloxi-4-metoxibenzaldehído (39b).** El compuesto **39b** se sintetizó mediante la metodología empleada para **37b** obteniéndose un rendimiento de 88%. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 9.81 (s, 1 H, -CHO) 7.43 – 7.49 (m, 4 H, Ar-H) 7.37 – 7.40 (m, 1 H, Ar-H) 7.35 – 7.38 (m, 1 H, Ar-H) 7.32 (d,  $J=6.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 6.99 (d,  $J=8.3$  Hz, 1 H, Ar-H) 5.19 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 3.96 (s, 3 H, Ar-OCH<sub>3</sub>). Anexo C, p. 227.

**α-(N-Metilanilino)acetonitrilo (51):** A 100 mL de CH<sub>3</sub>COOH se le agregaron 6,8 mL de N-metilanilina (1 eq.; 0,1 mol), 9,75 g de paraformaldehído (1,2 eq.; 0,12 mol) y 7,35 g de cianuro de sodio (1,5 eq.; 0,15 mol). La mezcla de reacción fue llevada a una temperatura de 50 °C hasta la desaparición de los sólidos (3 h). Una vez enfriada la mezcla de reacción, se agregaron 100 mL de agua y se realizó una extracción con 100 mL de DCM por triplicado. Luego se eliminó el solvente y se realizó la purificación a través de destilación a presión reducida: 140 °C y 6 Torr, obteniéndose 3,38g (52%) del compuesto **51** como un aceite anaranjado. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.27 – 7.34 (dd, 2H,  $J= 8.8, 7.3$  Hz) 6.88 – 6.95 (dd, 1H  $J=7.3, 1.0$  Hz) 6.82 – 6.88 (dd, 2H,  $J=8.8, 1.0$  Hz) 4.13 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>) 2.98 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>). Anexo C, p. 227.

**(Z,E)-3-(3-(Benciloxi)-4-metoxifenil)-2-(metil(fenil)amino)acrilonitrilo (41).** A 4 mL de benceno se le agregaron en el siguiente orden: 5,8 eq. de KOH (1,07 g; 19,14 mmol), 1,1 eq. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,5 g; 3,63 mmol), 0,25 eq. de TBA-Br (0,266 g; 0,825 mmol), 1 eq. de α-(N-metilanilino)acetonitrilo (0,482 g; 3,3 mmol) y finalmente 1 eq. de 3-benciloxi-4-metoxibenzaldehído (0,798 g; 3,3 mmol). La mezcla se calentó a reflujo suave hasta observar por medio de CCF la desaparición del aldehído (4,5 h) y luego se dejó por 16 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se filtra con Celite® y se eliminó el solvente a presión reducida. La purificación se realizó por medio de cromatografía en columna “flash” utilizando

un "cabeza" sólida y como fase móvil una mezcla de AcOEt-hexano 1:4, obteniéndose un rendimiento de 82% de la mezcla de isómeros *Z* y *E*. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 6.81 – 7.49 (m, 13H, Ar-H) 6.77 (s, 0,6 H, (*Z*) =CH) 6.64 (s, 0.4 H, (*E*) =CH) 5.18 (s, 0.8 H, (*E*) Ar-CH<sub>2</sub>-O) 4.92 (s, 1.2 H, (*Z*) Ar-CH<sub>2</sub>-O) 3.90 (s, 1.2 H, (*E*) ArO-CH<sub>3</sub>) 3.89 (s, 1.8 H, (*Z*) ArO-CH<sub>3</sub>) 3.23 (s, 1.2 H, (*E*) N-CH<sub>3</sub>) 2.90 (s, 1.8 H, (*Z*) N-CH<sub>3</sub>). Anexo C, p. 228.

**(*Z,E*)-3-(4-(Benciloxi)-3-metoxifenil)-2-(metil(fenil)amino)acrilonitrilo (50)**. El compuesto **50** se sintetizó mediante la metodología empleada para **41** obteniéndose un rendimiento de 71%. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 6.79 – 7.45 (m, 13H, Ar-H) 6.83 (s, 0.44 H, (*Z*) =CH) 6.66 (s, 0.56 H, (*E*) =CH) 5.19 (s, 1.1 H, (*E*) Ar-CH<sub>2</sub>-O) 5.15 (s, 0.9 H, (*Z*) Ar-CH<sub>2</sub>-O) 3.95 (s, 1.7 H, (*E*) ArO-CH<sub>3</sub>) 3.67 (s, 1.3 H, (*Z*) ArO-CH<sub>3</sub>) 3.27 (s, 1.7 H, (*E*) N-CH<sub>3</sub>) 3.15 (s, 1.3 H, (*Z*) N-CH<sub>3</sub>). Anexo C, p. 228.

**Ácido 2-(3-benciloxi-4-metoxifenil)acético (36b)**. 8,90 g de la mezcla (*Z,E*) de **41** (24 mmol), se disolvieron en 200 mL de THF. A la solución resultante se le agregó un volumen igual de HCl al 10% v/v en agua. La mezcla se calentó a reflujo suave por 24 h y una vez transcurrido el tiempo se enfrió y se realizó la extracción de la fase orgánica. Ésta fue tratada tres veces con una solución acuosa al 1% p/v de NaOH y nuevamente puesta en las condiciones iniciales de temperatura. El extracto acuoso, por su parte, fue acidificado y fase orgánica resultante se extrajo con DCM. El extracto fue secado con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrado. El procedimiento anterior se repitió en total tres veces obteniéndose: 4,27 g, 1,13 g y 0,26 g del ácido **36b** en cada ciclo sucesivo. Al finalizar los ciclos de hidrólisis el ácido **36b** se obtuvo con un rendimiento de 75% (5,66 g, 20,8 mmol). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.40 – 7.46 (m, 2 H, Ar-H) 7.35 (m, 2 H, Ar-H) 7.29 (d, *J*=6.8 Hz, 1 H, Ar-H) 6.80 – 6.89 (m, 3 H, Ar-H) 5.13 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 3.86 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.54 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>). Anexo C, p. 229.

**Ácido 2-(4-benciloxi-3-metoxifenil)acético (44b)**. El compuesto **44b** se sintetizó por medio de la metodología empleada para **36b** obteniéndose un rendimiento de 86%. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz,

CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.40 – 7.44 (m, 2 H, Ar-H) 7.32 – 7.38 (m, 2 H, Ar-H) 7.28 – 7.32 (m, 1 H, Ar-H) 6.84-6.82 (d, 1H,  $J=8.3$  Hz, Ar-H) 6.83 (d, 1H,  $J=2.0$  Hz, Ar-H) 6.73 – 6.77 (dd, 1 H,  $J= 8.3, 2.0$  Hz, Ar-H) 5.13 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 3.88 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.57 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>). Anexo C, p. 229.

***N*-(4-(Benciloxi)-3-metoxifeniletil)-2-(3-(benciloxi)-4-metoxifenil)acetamida (34b)**. A una solución 1 M del compuesto **36b** (6,6 g; 24,2 mmol) en THF (25 mL) se le agregó 1,1 eq. de CDI (4,3 g; 26,7 mmol) y se dejó reaccionar por 2 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 1,2 eq. de la amina **34b** (7,5 g; 29 mmol) disuelta en 25 mL de THF. La mezcla de reacción se dejó por 16 h observándose la formación de un precipitado, el cual fue filtrado y lavado con la mínima cantidad de THF y MeOH. La purificación del compuesto se realizó por medio de una cristalización con AcOEt y una recristalización de las aguas madres con una mezcla de DCM-AcOEt. Finalmente se obtuvieron 11,7 g (94%) del compuesto **34b** como un polvo blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.38 – 7.46 (m, 4 H, Ar-H) 7.35 (m, 4 H, Ar-H) 7.27 – 7.31 (m, 2 H, Ar-H) 6.79 (d,  $J=8.1$  Hz, 1 H, Ar-H) 6.72 (d,  $J=8.1$  Hz, 1 H, Ar-H) 6.72 (d,  $J=1.9$  Hz, 1 H, Ar-H) 6,67 (dd,  $J=8.1, 1.9$  Hz, 1 H, Ar-H) 6.62 (d,  $J=1.9$  Hz, 1 H, Ar-H) 6.44 (dd,  $J=8.1, 1.8$  Hz, 1 H, Ar-H) 5.31 (br. s., 1 H, N-H) 5.10 (m, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 3.87 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.83 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.41 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>) 3.38 (q,  $J=6.8$  Hz, 2 H, N-CH<sub>2</sub>) 2.60 (t,  $J=6.8$  Hz, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>). Anexo C, p. 230.

**(±)7-(Benciloxi)-1-(3-(benciloxi)-4-metoxibencil)-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (THIQ\_IsoBnVai) (52a)** A 1 eq. de la amida **34b** (3,3 g; 6,9 mmol) se le agregó 100 mL de benceno y 10 mL de POCl<sub>3</sub>. Posteriormente, la mezcla de reacción se llevó a temperatura de reflujo por 2,5 h. Luego se eliminó el solvente y el exceso de POCl<sub>3</sub> por evaporación observándose la deposición de una aceite marrón en las paredes del recipiente. El aceite formado se disolvió en 50 mL de MeOH y se agregó lentamente 7 eq. de NaBH<sub>4</sub> (1,8 g; 48 mmol). Una vez agregado el agente reductor la mezcla se dejó (con agitación) a temperatura ambiente por 0,5

h y luego por 0,5 h a temperatura de reflujo. Después de enfriar la mezcla se eliminó el solvente, el precipitado formado se disolvió en H<sub>2</sub>O y subsecuentemente se realizó sobre el componente orgánico una extracción con éter etílico, un lavado con H<sub>2</sub>O y secado con MgSO<sub>4</sub>. La purificación del residuo se realizó a través de cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt-MeOH 4:1, obteniéndose 1,9 g (56%) del compuesto **52a**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7.36 – 7.47 (m, 8H, Ar-H) 7.30 – 7.36 (m, 2H, Ar-H) 6.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar-H) 6.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H) 6.80 (s, 1H, Ar-H) 6.78 (dd, *J* = 1.5, 8.3 Hz, 1H, Ar-H) 6.66 (s, 1H, Ar-H) 5.05 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 4.97 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 3.96 (dd, *J* = 4.4, 8.8 Hz, 1H, Ar-CH-N) 3.75 (s, 3H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.73 (s, 3H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.05 (dt, *J* = 5.9, 11.7 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>-) 2.99 (dd, *J* = 4.4, 13.2 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>-) 2.75 (dt, *J* = 5.9, 11.7 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>-) 2.73 (dd, *J* = 8.8, 13.2 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>-) 2.56 – 2.62 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 230.

**(±)7-(Benciloxi)-1-(5-(benciloxi)-2-bromo-4-metoxibencil)-6-metoxi-1,2,3,4-**

**tetrahidroisoquinolina (52b)**. A una solución al 8% p/v de **52a** (1,8 g; 3,6 mmol) en CH<sub>3</sub>COOH (22 mL) se le agregaron lentamente 1 eq. de Br<sub>2</sub> (3,6 mmol) desde una solución 4 M en CH<sub>3</sub>COOH. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente se basificó con una solución al 10% p/v de NaOH y se realizó una extracción con éter etílico. La fase orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O y se secó con MgSO<sub>4</sub>. La purificación del residuo se realizó a través de cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt-MeOH 4:1, obteniéndose 0,85 g (40%) del compuesto **52b**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.27 – 7.48 (m, 10 H, Ar-H) 7.07 (s, 1 H, Ar-H) 6.76 (s, 1 H, Ar-H) 6.74 (s, 1 H, Ar-H) 6.61 (s, 1 H, Ar-H) 5.05 – 5.20 (m, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 4.13 (c, 1 H, N-H) 4.03 (dd, *J* = 10.0, 3.2 Hz, 1 H, Ar-CH-N) 3.88 (m, 6 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.05 – 3.15 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-) 2.66 – 2.85 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 231.

**(±)7-(Benciloxi)-1-(5-(benciloxi)-2-cloro-4-metoxibencil)-6-metoxi-1,2,3,4-**

**tetrahidroisoquinolina (52c)**. A una solución 0,1 M del compuesto **52a** (511 mg; 1,03 mmol)

en CH<sub>3</sub>COOH se le agregó 1 eq. de SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (145,9mg; 1,08mmol; 0,084 mL) a temperatura ambiente. La reacción se detuvo una vez transcurridas 2,5 h agregando gota a gota una solución 5 M de NaOH. Una vez alcanzado un pH 9 se realizó una extracción con AcOEt (3x15 mL), luego la fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró. La purificación del residuo se realizó a través de cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt-MeOH 4:1, obteniéndose 191 mg (35%) del compuesto **52c**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.20 – 7.47 (m, 10 H, Ar-H) 6.89 (s, 1 H, Ar-H) 6.71 (s, 1 H, Ar-H) 6.70 (s, 1 H, Ar-H) 6.58 (s, 1 H, Ar-H) 5.08 (m, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O) 4.03 (d, *J*=9.3 Hz, 1 H, Ar-CH-N) 3.83 (s, 6 H, ArO-CH<sub>3</sub>), 2.99 – 3.18 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-) 2.62 – 2.88 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 231.

**Clorhidrato de (±)1-(2-bromo-5-hidroxi-4-metoxibencil)-7-hidroxi-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (33b)**. Una solución 1,25% p/v de **52b** (500 mg; 0,87 mmol) en una mezcla de solventes EtOH-HCl<sub>f</sub> 1:1 se calentó a reflujo por 3 horas. Posteriormente se removió el solvente y a modo de purificación se realizó una cristalización y recristalización utilizando como solventes una mezcla de MeOH-éter etílico obteniéndose 430 mg (88%) del compuesto **33b**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9.20 – 9.36 (m, 3 H, -NH<sub>2</sub><sup>+</sup>/Ar-OH) 9.03 (s, 1 H, Ar-OH) 7.18 (s, 1 H, Ar-H) 6.95 (s, 1 H, Ar-H) 6.78 (s, 1 H, Ar-H) 6.55 (s, 1 H, Ar-H) 4.50 (br. s., 1 H, Ar-CH-N) 3.81 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.76 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 2.76 – 3.50 (m, 6 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 232.

**Clorhidrato de (±)1-(2-cloro-5-hidroxi-4-metoxibencil)-7-hidroxi-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (33c)**. El compuesto **33c** se sintetizó mediante la metodología empleada para **33b** obteniéndose un rendimiento de 82%. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9.13 – 9.31 (s, 3 H, -NH<sub>2</sub><sup>+</sup>/Ar-OH) 9.00 (s, 1 H, Ar-OH) 7.04 (s, 1 H, Ar-H) 6.90 (s, 1 H, Ar-H) 6.76 (s, 1 H, Ar-H) 6.48 (s, 1 H, Ar-H) 4.49 (br. s., 1 H, Ar-CH-N) 3.80 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.75 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 2.81 – 3.49 (m, 6 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 232.

**Clorhidrato** de **(±)12-bromo-2,9-dihidroxi-3,10-dimetoxi-5,6,7,8,13,13a-hexahidroisoquinolino[3,2-a]isoquinolina** (*clorhidrato de 12-bromoescoulerina*) (**32b**) Una solución 0,05 M de **33b** (500 mg; 0,87 mmol) en una mezcla de solventes EtOH-formalina 1:1 al 28% se calentó a reflujo por 3 horas. Posteriormente, una vez fría la mezcla de reacción, se agregó NH<sub>3</sub> al 25%, se realizó una extracción con AcOEt, se removió el solvente y a modo de purificación se formó el clorhidrato de 12-bromoescoulerina utilizando 1eq de HCl fumante obteniéndose 281 mg (73%) del compuesto **32b**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9.61 (s, 1 H, Ar-OH) 9.16 (s, 1 H, Ar-OH) 7.26 (s, 1 H, Ar-H) 6.85 (br. s., 1 H, Ar-H) 6.80 (s, 1 H, Ar-H) 4.83 (br. s., 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N) 4.60 – 4.72 (m, 1 H, Ar-CH-N) 4.15 – 4.60 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-), 3.85 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.78 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.45 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-) 2.86 (dd, *J*=16.6 11.7 Hz, 2 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 233.

**Clorhidrato** de **(±)12-cloro-2,9-dihidroxi-3,10-dimetoxi-5,6,7,8,13,13a-hexahidroisoquinolino[3,2-a]isoquinolina** (*clorhidrato de 12-cloroescoulerina*) (**32c**). El compuesto **32c** se sintetizó mediante la metodología empleada para **32b** obteniéndose un rendimiento de 64%. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9.56 (s, 1 H, Ar-OH) 9.13 (s, 1 H, Ar-OH) 7.12 (s, 1 H, Ar-H) 6.87 (br. s., 1 H, Ar-H) 6.78 (s, 1 H, Ar-H) 4.05 – 4.89 (m, 5 H, Ar-CH-N/-CH<sub>2</sub>-) 3.84 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.77 (s, 3 H, ArO-CH<sub>3</sub>) 3.54 (br. s., 2 H, -CH<sub>2</sub>-) 2,71 – 3,01 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-). Anexo C, p. 233.



## Bibliografía

Aboraia, A. S., Yee, S. W., Gomaa, M. S., Shah, N., Robotham, A. C., Makowski, B., Prosser, D., Brancale, A., Jones, G., Simons, C. (2010) Synthesis and CYP24A1 inhibitory activity of N-(2-(1H-imidazol-1-yl)-2-phenylethyl)arylamides. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 4939-4946.

Akkirala, V. N. (2007) Microwave Promoted Alkylation of Halonitrobenzene with Malonates in Solvent-free Medium. *Catal. Lett.*, **121**, 81-84.

Allen, C. F. H. y VanAllan, J. A. (1947, 1955) Dimethylaminoacetonitrile, *Org. Synth., Coll.*, **27**, 20; **3**, 275.

Amenta, F., Ferrante, F., Ricci, A. (1995) Pharmacological Characterisation and Autoradiographic Localisation of Dopamine Receptor Subtypes in the Cardiovascular System and in the Kidney. *Hypertens. Res.*, **18**, S23-S27.

Antoine, M., Marchand, P., Le Baut, G., Czech, M., Baasner, S., Gunther, E. (2008) Side chain modifications of (indol-3-yl)glyoxamides as antitumor agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **23**, 686-695.

Asano, Y., Kitamura, S., Ohra, T., Itoh, F., Kajino, M., Tamura, T., Kaneko, M., Ikeda, S., Igata, H., Kawamoto, T., Sogabe, S., Matsumoto, S.-i., Tanaka, T., Yamaguchi, M., Kimura, H., Fukumoto, S. (2008) Discovery, synthesis and biological evaluation of isoquinolones as novel and highly selective JNK inhibitors (2). *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 4699-4714.

Asencio, M., Hurtado-Guzmán, C., López, J. J., Cassels, B. K., Protais, P., Chagraoui, A. (2005) Structure-affinity relationships of halogenated predi-centrine and glaucine derivatives at D1 and D2 dopaminergic receptors: halogenation and D1 receptor selectivity. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 3699-3704.

Auffinger, P., Hays, F. A., Westhof, E., Ho, P. S. (2004) Halogen bonds in biological molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 16789-16794.

Bahena-Trujillo, R., Flores, G., Arias-Montaño, J. A. (2000) Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, **11**, 21.

Ballesteros, J. A. y Weinstein, H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In *Methods in Neurosciences* (ed. by C. S. Stuart), pp. 366-428. Academic Press.

Beguín, C., Carlezon, W. A., Cohen, B. M., He, M., Lee, D. Y.-W., Richards, M. R., Liu-Chen, L. Y. (2006) Salvinorin Derivatives and Uses Thereof, pp. 29.

Berger, J. G., Chang, W. K., Clader, J. W., Hou, D., Chipkin, R. E., McPhail, A. T. (1989) Synthesis and receptor affinities of some conformationally restricted analogs of the dopamine D1 selective ligand (5R)-8-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1H-3-benzazepin-7-ol. *J. Med. Chem.*, **32**, 1913-1921.

Bezzu, C. G., Carta, M., Tonkins, A., Jansen, J. C., Bernardo, P., Bazzarelli, F., McKeown, N. B. (2012) A Spirobifluorene-Based Polymer of Intrinsic Microporosity with Improved Performance for Gas Separation. *Adv. Mater.*, **24**, 5930-5933.

Bonjoch, J., Fernández, J.-C., Valls, N. (1998) Total Syntheses of ( $\pm$ )-Deethylbiphyllidine Using a Crisscross Annulation: Ring Cleavage of Octahydroindolo[2,3-a]quinolizines Followed by Tandem Cyclizations of Octahydroazecino[5,4-b]indoles. *J. Org. Chem.*, **63**, 7338-7347.

Boyle, R. G., Walker, D. W., Boyce, R. J. (2011) Pharmaceutical Compounds, *WO 2011/141716 A2*: 86

Brooks, D. (2000) Dopamine agonists: their role in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **68**, 685-689.

Bruggink, A. y McKillop, A. (1975) A study of the copper-catalysed direct arylation of  $\beta$ -dicarbonyl compounds with 2-bromobenzoic acids. *Tetrahedron*, **31**, 2607-2619.

Burt, D., Creese, I., Snyder, S. (1977) Antischizophrenic drugs: chronic treatment elevates dopamine receptor binding in brain. *Science*, **196**, 326-328.

Calverley, M. J., Harley-Mason, J., Quarrie, S. A., Edwards, P. D. (1981) On the stereochemistry of the solvolytic c/d ring cleavage of the 1,2,3,4,6,7,12,12b-octahydroindolo[2,3-a] quinolizine system. *Tetrahedron*, **37**, 1547-1556.

Carati, C. y Schenk, S. (2011) Role of dopamine D1- and D2-like receptor mechanisms in drug-seeking following methamphetamine self-administration in rats. *Pharmacol., Biochem. Behav.*, **98**, 449-454.

Carey, F. A. y Sundberg, R. J. (2007) *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY 10013, USA.

Clark, A. H., McCorvy, J. D., Watts, V. J., Nichols, D. E. (2011) Assessment of dopamine D1 receptor affinity and efficacy of three tetracyclic conformationally-restricted analogs of SKF38393. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 5420-5431.

Clark, J. D., Weisenburger, G. A., Anderson, D. K., Colson, P.-J., Edney, A. D., Gallagher, D. J., Kleine, H. P., Knable, C. M., Lantz, M. K., Moore, C. M. V., Murphy, J. B., Rogers, T. E.,

Ruminski, P. G., Shah, A. S., Storer, N., Wise, B. E. (2004) Pilot Plant Preparation of an  $\alpha\beta$  Integrin Antagonist. Part 1. Process Research and Development of a (S)- $\beta$ -Amino Acid Ester Intermediate: Synthesis via a Scalable, Diastereoselective Imino-Reformatsky Reaction. *Org. Process Res. Develop.*, **8**, 51-61.

Carstens, J., Heinrich, M. R., Steglich, W. (2013) Studies on the synthesis and biosynthesis of the fungal alkaloid necatorone. *Tetrahedron Lett.*, **54**, 5445-5447.

Corominas, M., Roncero, C., Bruguera, E., Casas, M. Sistema dopaminérgico y adicciones. *RevNeurol*, **44**, 0023-0031.

Chai, W., Breitenbucher, J. G., Kwok, A., Li, X., Wong, V., Carruthers, N. I., Lovenberg, T. W., Mazur, C., Wilson, S. J., Axe, F. U., Jones, T. K. (2003) Non-imidazole heterocyclic histamine H3 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1767-1770.

Chemel, B. R., Bonner, L. A., Watts, V. J., Nichols, D. E. (2012) Ligand-Specific Roles for Transmembrane 5 Serine Residues in the Binding and Efficacy of Dopamine D1 Receptor Catechol Agonists. *Mol. Pharmacol.*, **81**, 729-738.

Chien, E. Y. T., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Won Han, G., Hanson, M. A., Shi, L., Newman, A. H., Javitch, J. A., Cherezov, V., Stevens, R. C. (2010) Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist. *Science*, **330**, 1091-1095.

Chipkin, R. E., Iorio, L. C., Coffin, V. L., McQuade, R. D., Berger, J. G., Barnett, A. (1988) Pharmacological profile of SCH39166: a dopamine D1 selective benzonaphthazepine with potential antipsychotic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **247**, 1093-1102.

Cooley, J. H. y Evain, E. J. (1989) Amine Dealkylations with Acyl Chlorides. *Synthesis*, 1-7.

Cueva, J. P., Gallardo-Godoy, A., Juncosa, J. I., Vidi, P. A., Lill, M. A., Watts, V. J., Nichols, D. E. (2011) Probing the Steric Space at the Floor of the D1 Dopamine Receptor Orthosteric Binding Domain: 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -, 8 $\alpha$ -, and 8 $\beta$ -Methyl Substituted Dihydropyridine Analogues. *J. Med. Chem.*, **54**, 5508-5521.

Cutler, H. G., Majetich, G., Tian, X., Spearing, P. (1997) Syntheses of 3,7-Dimethyl-8-hydroxy-6-methoxyisochroman, the 3,7-Dimethyl-6-hydroxy-8-methoxy Isomer, and Their Ester and Ether Derivatives: Plant Growth Regulatory Activity. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1422-1429.

De Luca, L., Gitto, R., Barreca, M. L., Caruso, R., Quartarone, S., Citraro, R., De Sarro, G., Chimirri, A. (2006) 3D Pharmacophore Models for 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Derivatives Acting as Anticonvulsant Agents. *Archiv der Pharmazie*, **339**, 388-400.

De Oliveira, I. R. y Juruena, M. F. (2006) Treatment of psychosis: 30 years of progress. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **31**, 523-534.

Dimroth, K. y Aurich, H. G. (1965) Zur Cyanmethylierung schwach basischer Amine. *Chem. Ber.*, **98**, 3902-3906.

Dumas, J.-M., Peurichard, H., Gomel, M. (1987) CX4...Base Interactions as Models Of Weak Charge-transfer Interactions: Comparison with Strong Charge-transfer and Hydrogen-bond Interaction. *J. Chem. Res., Synop.*, **2**, 2.

Enzensperger, C., Müller, F. K. U., Schmalwasser, B., Wiecha, P., Traber, H., Lehmann, J. (2007) Dopamine/Serotonin Receptor Ligands. 16. Expanding Dibenz[d,g]azecines to 11- and 12-Membered Homologues. Interaction with Dopamine D1-D5 Receptors. *J. Med. Chem.*, **50**, 4528-4533.

Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U., Sali, A. (2006) Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*, **05**, Unit-5.6.

Fiser, A., Do, R. K. G., Šali, A. (2000) Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci.*, **9**, 1753-1773.

Freneau, R. T., Duncan, G. E., Fornaretto, M. G., Dearry, A., Gingrich, J. A., Breese, G. R., Caron, M. G. (1991) Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 3772-3776.

Fu, W., Shen, J., Luo, X., Zhu, W., Cheng, J., Yu, K., Briggs, J. M., Jin, G., Chen, K., Jiang, H. (2007) Dopamine D1 Receptor Agonist and D2 Receptor Antagonist Effects of the Natural Product (-)-Stepholidine: Molecular Modeling and Dynamics Simulations. *Biophys. J.*, **93**, 1431-1441.

Gershon, A. A., Vishne, T., Grunhaus, L. (2007) Dopamine D2-Like Receptors and the Antidepressant Response. *Biol. Psychiatry*, **61**, 145-153.

Gingrich, J. A. y Caron, M. G. (1993) Recent Advances in the Molecular Biology of Dopamine Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, **16**, 299-321.

Hardman, J. G., Goodman-Gilman, A. y Limbird, L. E., Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. *9th ed., McGraw-Hill*. 1995: 282-283

Graham L. P. (1995) An Introduction to Medicinal Chemistry. Chapter 9, Quantitative structure-activity relationships (QSAR). *Oxford University Press Inc., New York*, 156

Greene, T. W. y Wuts, P. G. M. (1991) *Protective Groups in Organic Synthesis*. John Wiley and Sons, Inc, Canada.

Haga, K., Kruse, A. C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W. I., Okada, T., Kobilka, B. K., Haga, T., Kobayashi, T. (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*, **482**, 547-551.

Hardegger, L. A., Kuhn, B., Spinnler, B., Anselm, L., Ecabert, R., Stihle, M., Gsell, B., Thoma, R., Diez, J., Benz, J., Plancher, J.-M., Hartmann, G., Banner, D. W., Haap, W., Diederich, F. (2011) Systematic Investigation of Halogen Bonding in Protein-Ligand Interactions. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 314-318.

Hassel, O. (1970) Structural aspects of interatomic charge-transfer bonding. In *Proceedings of the Nobel Lecture*.

Hassel, O. y Hvorslef, J. (1954) The structure of bromide 1,4-dioxano. *Acta Chem. Scand.*, **8**, 873.

Hoefgen, B., Decker, M., Mohr, P., Schramm, A. M., Rostom, S. A. F., El-Subbagh, H., Schweikert, P. M., Rudolf, D. R., Kassack, M. U., Lehmann, J. (2006) Dopamine/Serotonin Receptor Ligands. 10: SAR Studies on Azecine-type Dopamine Receptor Ligands by Functional Screening at Human Cloned D1, D2L, and D5 Receptors with a Microplate Reader Based Calcium Assay Lead to a Novel Potent D1/D5 Selective Antagonist. *J. Med. Chem.*, **49**, 760-769.

Hojo, M. y Masuda, R. (1975) Electrophilic Chlorination by Sulfuryl Chloride in the Presence of Silica Gel. *Syn. Commun.*, **5**, 169-171.

Huang, J., Chen, S., Zhang, J. J., Huang, X.-Y. (2013) Crystal structure of oligomeric  $\beta$ 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol*, **20**, 419-425.

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics*, **14**, 33-38.

Iorio, L. C., Barnett, A., Leitz, F. H., Houser, V. P., Korduba, C. A. (1983) SCH 23390, a potential benzazepine antipsychotic with unique interactions on dopaminergic systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **226**, 462-468.

Ito, F., Iwasaki, M., Watanabe, T., Ishikawa, T., Higuchi, Y. (2005) The first total synthesis of kwakhurin, a characteristic component of a rejuvenating plant, "kwao keur": toward an efficient synthetic route to phytoestrogenic isoflavones. *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 674-681.

Iturriaga-Vásquez, P., Miquel, R., Ivorra, M. D., D'Ocon, M. P., Cassels, B. K. (2003) Simplified Tetrandrine Congeners as Possible Antihypertensive Agents with a Dual Mechanism of Action. *J. Nat. Prod.*, **66**, 954-957.

Jaakola, V.-P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y. T., Lane, J. R., IJzerman, A. P., Stevens, R. C. (2008) The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science*, **322**, 1211-1217.

Jiao, M., Yang, G., Yu-She, Y., Jing-Shan, S., Guo-Zhang, J., Xuechu, Z. (2007) Recent Developments in Studies of 1-Stepholidine and its Analogs: Chemistry, Pharmacology and Clinical Implications. *Curr. Med. Chem.*, **14**, 2996-3002.

Jones, R. A. (2001) *Quaternary Ammonium Salts: Their Use in Phase-Transfer Catalysis*. Academic Press.

Jose, P. A., Raymond, J. R., Bates, M. D., Aperia, A., Felder, R. A., Carey, R. M. (1992) The renal dopamine receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2**, 1265-1278.

Kagel, R. O. (2000) Section 6, Raman Spectroscopy. In *Practical Handbook of Spectroscopy* (ed. by J. W. Robinson), pp. 555. CRC press, United State.

Kametani, T. y Ihara, M. (1967) An alternative total synthesis of (+/-)-scoulerine and (+/-)-tetrahydropalmatine. *J. Chem Soc. (C)*, 530-532.

Kametani, T., Noguchi, I., Saito, K., Kaneda, S. (1969) Studies on the syntheses of heterocyclic compounds. Part CCCII. Alternative total syntheses of (+/-)-nandinine, (+/-)-canadine, and berberine iodide. *J. Chem Soc. (C)*, 2036-2038.

Kang, D. W., Kim, Y. S., Lim, K. S., Kim, M. S., Pearce, L. V., Pavlyukovets, V. A., Tao, A. K., Lang-Kuhs, K. A., Blumberg, P. M., Lee, J. (2010) Halogenation of 4-hydroxy/amino-3-methoxyphenyl acetamide TRPV1 agonists showed enhanced antagonism to capsaicin. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 8092-8105.

Karnik, S. S., Gogonea, C., Patil, S., Saad, Y., Takezako, T. (2003) Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **14**, 431-437.

Kołaczkowski, M., Bucki, A., Feder, M., Pawłowski, M. (2013) Ligand-Optimized Homology Models of D1 and D2 Dopamine Receptors: Application for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.*, **53**, 638-648.

Kolar, M., Hobza, P., Bronowska, A. K. (2013) Plugging the explicit [sigma]-holes in molecular docking. *Chem. Commun.*, **49**, 981-983.

Kozikowski, A. P., Ishida, H., Chen, Y.-Y. (1980) New synthesis and some selected reactions of the potential ergot alkaloid precursor indole-4-carboxaldehyde. *J. Org. Chem*, **45**, 3350-3352.

Kebabian, J. W. y Calne, D. B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*, **277**, 93-96.

Kolar, M., Hobza, P., Bronowska, A. K. (2013) Plugging the explicit [sigma]-holes in molecular docking. *Chemical Communications*, **49**, 981-983.

Konishi, H., Aritomi, K., Okano, T., Kiji, J. (1989) A Mild Selective Monobromination Reagent System for Alkoxybenzenes; *N*-Bromosuccinimide–Silica Gel. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 591-593.

Krapcho, A. P., Weimaster, J. F., Eldridge, J. M., Jahngen, E. G. E., Lovey, A. J., Stephens, W. P. (1978) Synthetic applications and mechanism studies of the decarbalkoxylations of geminal diesters and related systems effected in dimethyl sulfoxide by water and/or by water with added salts. *J. Org. Chem.*, **43**, 138-147.

Lang, P. T., Brozell, S. R., Mukherjee, S., Pettersen, E. F., Meng, E. C., Thomas, V., Rizzo, R. C., Case, D. A., James, T. L., Kuntz, I. D. (2009) DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes. *RNA*, **15**, 1219-1230.

Laskowski, R. A., Hutchinson, E. G., Michie, A. D., Wallace, A. C., Jones, M. L., Thornton, J. M. (1997) PDBsum: a web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 488-490.

Lee, K.-J., Cho, H. K., Song, C.-E. (2002) Bromination of Activated Arenes by Oxone® and Sodium Bromide. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **23**, 773-775.

Lehmann, J., Mohr, P., Schweikert, P. M., Decker, M., Hoefgen, B. (2006) Neue hochaffine Dopaminantagonisten zur Behandlung der Schizophrenie und Verfahren zu ihrer Herstellung, Alemania. DE 102005/025625 A1

Lewis, J. W., Szundi, I., Kazmi, M. A., Sakmar, T. P., Kliger, D. S. (2006) Proton Movement and Photointermediate Kinetics in Rhodopsin Mutants. *Biochemistry*, **45**, 5430-5439.

Liu, C. T., Sun, S. C., Yu, Q. S. (1983) Synthesis and photooxidation of the condensation products of tryptamine and catechol derivatives. An approach to the synthesis of a probable precursor of koumine. *J. Org. Chem.*, **48**, 44-47.

Liu, T., Zhu, C., Yang, H., Fu, H. (2012) Copper-Catalyzed Domino Synthesis of Isoquinolino[2,3-*a*]quinazolinones. *Adv. Synth. Catal.*, **354**, 1579-1584.

Lu, Y., Shi, T., Wang, Y., Yang, H., Yan, X., Luo, X., Jiang, H., Zhu, W. (2009) Halogen Bonding—A Novel Interaction for Rational Drug Design? *J. Med. Chem.*, **52**, 2854-2862.

Magnus, N. A., Campagna, S., Confalone, P. N., Savage, S., Meloni, D. J., Waltermire, R. E., Wethman, R. G., Yates, M. (2010) Quaternary Chiral Center via Diastereoselective Enolate Amination Enables the Synthesis of an Anti-inflammatory Agent. *Org. Process Res. Develop.*, **14**, 159-167.

Malo, M., Brive, L., Luthman, K., Svensson, P. (2010) Selective Pharmacophore Models of Dopamine D1 and D2 Full Agonists Based on Extended Pharmacophore Features. *ChemMedChem*, **5**, 232-246.

Malo, M., Brive, L., Lufhman, K., Svensson, P. (2012) Investigation of D(1) Receptor–Agonist Interactions and D(1)/D(2) Agonist Selectivity Using a Combination of Pharmacophore and Receptor Homology Modeling. *ChemMedChem*, **7**, 483-494.

Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Šali, A. (2000) Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 291-325.

Martínez, S., Madrero, Y., Elorriaga, M., Noguera, M.-A., Cassels, B., Sobarzo, E., D'Ocon, P., Ivorra, M.-D. (1999) Halogenated derivatives of boldine with high selectivity for  $\alpha$ 1A-adrenoceptors in rat cerebral cortex. *Life Sci.*, **64**, 1205-1214.

Maryanoff, B. E. y Almond, H. R. (1986) Stereochemistry and conformation of a nitrogen-containing, medium-sized ring: hexahydro-1-phenyl-3-benzazone derivatives. High 1,4-diastereoselectivity in hydrogenation of an exocyclic alkene. *J. Org. Chem.*, **51**, 3295-3302.

Matsui, T., Sugiura, T., Nakai, H., Iguchi, S., Shigeoka, S., Takada, H., Odagaki, Y., Nagao, Y., Ushio, Y. (1992) Novel 5-HT<sub>3</sub> antagonists. Isoquinolinones and 3-aryl-2-pyridones. *J. Med. Chem.*, **35**, 3307-3319.

McDonald, M. C., Mota-Filipe, H., Wright, J. A., Abdelrahman, M., Threadgill, M. D., Thompson, A. S., Thiernemann, C. (2000) Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase on the organ injury and dysfunction caused by haemorrhagic shock. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 843-850.

McQuade, R. D., Duffy, R. A., Coffin, V. L., Chipkin, R. E., Barnett, A. (1991) In vivo binding of SCH 39166: a D-1 selective antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 42-49.

Melo, F. y Sali, A. (2007) Fold assessment for comparative protein structure modeling. *Protein Sci.*, **16**, 2412-2426.

Mečiarová, M., Toma, Š., Heribanová, A. (2000) Ultrasound Assisted Heterogeneous Permanganate Oxidations. *Tetrahedron*, **56**, 8561-8566.

Metrangolo, P., Meyer, F., Pilati, T., Resnati, G., Terraneo, G. (2008) Halogen Bonding in Supramolecular Chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 6114-6127.

Metro, T.-X., Bonnamour, J., Reidon, T., Sarpoulet, J., Martínez, J., Lamaty, F. (2012) Mechanochemistry of amides in the total absence of organic solvent from reaction to product recovery. *Chem. Commun.*, **48**, 11781-11783.

Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.*, **78**, 189-225.



Miyaura, N. y Suzuki, A. (1979) Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 866-867.

Mohr, P., Decker, M., Enzensperger, C., Lehmann, J. (2006) Dopamine/Serotonin Receptor Ligands. 12: SAR Studies on Hexahydro-dibenz[d,g]azecines Lead to 4-Chloro-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenz[d,g]azecin-3-ol, the First Picomolar D5-Selective Dopamine-Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.*, **49**, 2110-2116.

Moreira, I. S., Shi, L., Freyberg, Z., Ericksen, S. S., Weinstein, H. y Javitch, J. A. (2010) Structural Basis of Dopamine Receptor Activation En: Neve K.A. (Ed). The dopamine receptor. *2nd ed.*, Humana Press.: 47-52

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, **30**, 2785-2791.

Muathen, H. A. (1996) Mild chlorination of aromatic compounds with tin(IV) chloride and lead tetraacetate. *Tetrahedron*, **52**, 8863-8866.

Mukherjee, S., Balius, T. E., Rizzo, R. C. (2010) Docking Validation Resources: Protein Family and Ligand Flexibility Experiments. *J. Chem. Inf. Model.*, **50**, 1986-2000.

Neumeyer, J. L., Baidur, N., Niznik, H. B., Guan, H. C., Seeman, P. (1991) (+,-)-3-Allyl-6-bromo-7,8-dihydroxy-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine, a new high affinity D1 dopamine receptor ligand: synthesis and structure-activity relationship. *J. Med. Chem.*, **34**, 3366-3371.

Neumeyer, J. L., Kula, N. S., Bergman, J., Baldessarini, R. J. (2003) Receptor affinities of dopamine D1 receptor-selective novel phenylbenzazepines. *Eur. J. Pharmacol*, **474**, 137-140.

Nyrönen, T., Pihlavisto, M., Peltonen, J. M., Hoffrén, A.-M., Varis, M., Salminen, T., Wurster, S., Marjamäki, A., Kanerva, L., Katainen, E., Laaksonen, L., Savola, J.-M., Scheinin, M., Johnson, M. S. (2001) Molecular Mechanism for Agonist-Promoted  $\alpha$ 2A-Adrenoceptor Activation by Norepinephrine and Epinephrine. *Mol. Pharmacol*, **59**, 1343-1354.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., Miyano, M. (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science*, **289**, 739-745.

Pauling, L. (1960), The Nature of Chemical Bond. And The Structure Of Molecules and Crystals: An Introduction to Modern Structural Chemistry., *3Ed. Ithaca, New York, Cornell University Press.* p. 449

Paunescu, E., Matuszak, N., Melnyk, P. (2007) Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction as the key step for the synthesis of some new 4'-aryl and alkyl substituted analogues of amodiaquine and amopyroquine. *Tetrahedron*, **63**, 12791-12810.

Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, **26**, 1781-1802.

Politzer, P., Lane, P., Concha, M. C., Ma, Y., Murray, J. S. (2006) An overview of halogen bonding. *J. Mol. Model.*, **13**, 305-311.

Porcù, E., Sipos, A., Basso, G., Hamel, E., Bai, R., Stempfer, V., Udvardy, A., Bényei, A. C., Schmidhammer, H., Antus, S., Viola, G. (2014) Novel 9'-substituted-noscapines: Synthesis with Suzuki cross-coupling, structure elucidation and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, **84**, 476-490.

Qiang, L., Sasikumar, T. K., Burnett, D. A., Su, J., Tang, H., Ye, Y., Mazzola Jr, R. D., Zhu, Z., McKittrick, B. A., Greenlee, W. J., Fawzi, A., Smith, M., Zhang, H., Lachowicz, J. E. (2010) Discovery of new SCH 39166 analogs as potent and selective dopamine D1 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 836-840.

Quallich, G. J., Makowski, T. W., Sanders, A. F., Urban, F. J., Vazquez, E. (1998) Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines Containing Electron-Withdrawing Groups. *J. Org. Chem.*, **63**, 4116-4119.

Rasmussen, S. G. F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R. P., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F. X., Weis, W. I., Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human [bgr]2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **450**, 383-387.

Reddy, J. M., Kumar, K. V., Raju, V., Bhaskar, B. V., Himabindu, V., Bhattacharya, A., Sundaram, V., Banerjee, R., Reddy, G. M., Bandichhor, R. (2008) Alternative Total Synthesis of (-)-Galanthamine Hydrobromide. *Syn. Commun.*, **38**, 2138-2149.

Reichert, A., Frohlich, R., Ferguson, R., Kraft, A. (2001) Binding interactions between 3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-ones and a trisimidazoline base. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1321-1328.

Reid, C. S., Patrick, D. A., He, S., Fotie, J., Premalatha, K., Tidwell, R. R., Wang, M. Z., Liu, Q., Gershkovich, P., Wasan, K. M., Wenzler, T., Brun, R., Werbovetz, K. A. (2011) Synthesis and antitrypanosomal evaluation of derivatives of N-benzyl-1,2-dihydroquinolin-6-ols: Effect of core substitutions and salt formation. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 513-523.

Robaa, D., Eldin AbulAzm, S., Lehmann, J., Enzensperger, C. (2011) A Novel Non-phenolic Dibenzazecine Derivative with Nanomolar Affinities for Dopamine Receptors. *Chem. Biodiversity*, **8**, 431-439.

Sakai, S.-I., Kubo, A., Katano, K., Shinma, N., Sasago, K. (1973) Transformation of Indole Alkaloids. II. On the C/D Ring Opening and Closing Reactions of Indole Alkaloids and the Syntheses of Vobasine Type Alkaloids. *J. Pharm. Soc. Jpn.*, **93**, 1165-1182.

Sakai, S.-I., Yamanaka, E., Dolby, L. J. (1976) The Partial Synthesis of Burnamicine. *Heterocycles*, **4**, 4.

Sakamoto, T., Kondo, Y., Yamanaka, H. (1986) Condensed Heteroaromatic Ring Systems. VI. : Synthesis of Indoles and Pyroolopyridines from o-Nitroarylacetylenes. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2362-2368.

Šali, A. y Blundell, T. L. (1993) Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.*, **234**, 779-815.

Schill, G., Löwer, H., Priester, C. U., Windhövel, U. F., Fritz, H. (1987) Eine neue synthese von vinblastin-derivaten III: Synthesekonzept und modelluntersuchungen. *Tetrahedron*, **43**, 3729-3745.

Schulze, M., Müller, F. K. U., Mason, J. M., Görls, H., Lehmann, J., Enzensperger, C. (2009) Dibenzazecine scaffold rebuilding—Is the flexibility always essential for high dopamine receptor affinities? *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 6898-6907.

Seeman, P. (2010) Historical Overview: Introduction to the Dopamine Receptors. En: Neve K.A. (Ed). The dopamine receptor. *2nd ed., Humana press.* pp. 1-22

Selent, J., Sanz, F., Pastor, M., De Fabritiis, G. (2010) Induced Effects of Sodium Ions on Dopaminergic G-Protein Coupled Receptors. *PLoS Comput Biol*, **6**, e1000884.

Setler, P. E., Sarau, H. M., Zirkle, C. L., Saunders, H. L. (1978) The central effects of a novel dopamine agonist. *Eur. J. Pharmacol*, **50**, 419-430.

Sevryugina, Y., Rogachev, A. Y., Petrukhina, M. A. (2007) The First Hexanuclear Copper(I) Carboxylate: X-ray Crystal Structure and Reactivity in Solution and Gas-Phase Reactions. *Inorg. Chem.*, **46**, 7870-7879.

Silvestre, S. M.; Salvador, J. A. R. (2007) Allylic and benzylic oxidation reactions with sodium chlorite. *Tetrahedron*, **63**, 2439-2445.

Sippl, M. J. (1993) Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, **17**, 355-362.

Shen, M.-y. y Sali, A. (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, **15**, 2507-2524.

Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G. W., Kobayashi, T., Stevens, R. C., Iwata, S. (2011) Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*, **475**, 65-70.

Shoupe, T. S., Coutts, S. M., Dolby, L. J. (1990) Substituted Isoquinolines and Methods of Using Same, United States

Sipos, A., Kiss, B., Schmidt, É., Greiner, I., Berényi, S. (2008) Synthesis and neuropharmacological evaluation of 2-aryl- and alkylapomorphines. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 3773-3779.

Smith. (2001) *March's Advanced Organic Chemistry\_Reactions, Mechanisms, and Structure*. . John Wiley & Sons, Inc., United States of America.

Smith, K., Butters, M., Paget, W. E., Nay, B. (1985) New Reagent Systems for Electrophilic Chlorination of Aromatic Compounds: Organic Chlorine-Containing Compounds in the Presence of Silica. *Synthesis*, **1985**, 1155-1156.

Socrates, G. (1980) Infrared Characteristic group frequencies, A Wiley-Interscience publication, by *John Wiley & Sons, Ltd* p 4-24

Sobarzo-Sánchez, E. M., Arbaoui, J., Protais, P., Cassels, B. K. (2000) Halogenated Boldine Derivatives with Enhanced Monoamine Receptor Selectivity. *J. Nat. Prod.*, **63**, 480-484.

Somei, M., Karasawa, Y., Shoda, T., Kaneko, C. (1981) The Chemistry of Indoles. XII. A Facile Route to 5-Nitroisocoumarins and Methyl Indole-4-carboxylate. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 249-253.

Stålhandske, C. M. V., Stålhandske, C. I., Persson, I., Sandström, M., Jalilehvand, F. (2001) Crystal and Solution Structures of N,N-Dimethylthioformamide-Solvated Copper(I), Silver(I), and Gold(I) Ions Studied by X-ray Diffraction, X-ray Absorption, and Vibrational Spectroscopy. *Inorg. Chem.*, **40**, 6684-6693.

Suarez, T. E., Iwamoto, R. T., Kleinberg, J. (1973) Chloro complexes of copper(I) and copper(II) in dimethyl sulfoxide. *Inorg. Chim. Acta*, **7**, 292-298.

Taddese B., Simpson L. M., Wall I. D., Blaney, F. E. y Reynolds, C. A. (2013) CHAPTER TWO. Modeling Active GPCR Conformations. *Methods Enzymol.*, **522**, 21 – 35

Takahashi, K., Shibasaki, K., Ogura, K., Iida, H. (1983) Efficient method for a one-carbon homologation of aldehydes and benzophenone to carboxylic acids. *J. Org. Chem*, **48**, 3566-3569.

Takaya, D., Yamashita, A., Kamijo, K., Gomi, J., Ito, M., Maekawa, S., Enomoto, N., Sakamoto, N., Watanabe, Y., Arai, R., Umeyama, H., Honma, T., Matsumoto, T., Yokoyama, S. (2011) A new method for induced fit docking (genius) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 6892-6905.

Tomic, M., Seeman, P., George, S. R., Odowd, B. F. (1993) Dopamine D1 Receptor Mutagenesis: Role of Amino Acids in Agonist and Antagonist Binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 1020-1027.

Vaughan, C. J., Aherne, A. M., Lane, E., Power, O., Carey, R. M., O'Connell, D. P. (2000) Identification and regional distribution of the dopamine D1A receptor in the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.*, **279**, R599-R609.

Voth, A. R., Hays, F. A., Ho, P. S. (2007) Directing macromolecular conformation through halogen bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 6188-6193.

Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G. W., Tate, C. G., Schertler, G. F. X. (2008) Structure of a  $\beta(1)$ -adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature*, **454**, 486-491.

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., Barton, G. J. (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, **25**, 1189-1191.

Weiner, D. M., Levey, A. I., Sunahara, R. K., Niznik, H. B., O'Dowd, B. F., Seeman, P., Brann, M. R. (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 1859-1863.

Wiederstein, M. y Sippl, M. J. (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.*, **35**, W407-W410.

Wu, W.-L., Burnett, D. A., Spring, R., Greenlee, W. J., Smith, M., Favreau, L., Fawzi, A., Zhang, H., Lachowicz, J. E. (2005) Dopamine D1/D5 Receptor Antagonists with Improved Pharmacokinetics: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Phenol Bioisosteric Analogues of Benzazepine D1/D5 Antagonists. *J. Med. Chem.*, **48**, 680-693.

Xhaard, H., Rantanen, V.-V., Nyrönen, T., Johnson, M. S. (2006) Molecular Evolution of Adrenoceptors and Dopamine Receptors: Implications for the Binding of Catecholamines. *J. Med. Chem.*, **49**, 1706-1719.

Xu, Y., Xu, D. y Liang, H. (2007) Computational methods for protein structure prediction and modeling volume 2: structure prediction. *Springer Science + Business Media LLC., New York, U.S.A.* 144

Ye, N., Neumeier, J. L., Baldessarini, R. J., Zhen, X., Zhang, A. (2013) Update 1 of: Recent Progress in Development of Dopamine Receptor Subtype-Selective Agents: Potential Therapeutics for Neurological and Psychiatric Disorders. *Chem. Rev.*, **113**, PR123-PR178.

Zhang, A., Neumeier, J. L., Baldessarini, R. J. (2007) Recent Progress in Development of Dopamine Receptor Subtype-Selective Agents: Potential Therapeutics for Neurological and Psychiatric Disorders. *Chemical Reviews*, **107**, 274-302.

Zhang, J., Chen, X., Yu, L., Zhen, X., Zhang, A. (2008) Synthesis of 6-substituted 1-phenylbenzazepines and their dopamine D1 receptor activities. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 9425-9431.

Zhang, J., Xiong, B., Zhen, X., Zhang, A. (2009) Dopamine D1 receptor ligands: Where are we now and where are we going. *Med. Res. Rev.*, **29**, 272-294.

Zoete, V., Cuendet, M. A., Grosdidier, A., Michielin, O. (2011) SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem.*, **32**, 2359-2368.

Zhang, X., Glunz, P. W., Priestley, E. S., Johnson, J. A., Wurtz, N. R., Ladziata, V. (2013) Macrocyclic Factor VIIA inhibitors, pp. 55.

ANEXO A  
Simulación Molecular

Nomenclatura GPCR\_ nomenclatura de Ballesteros y Weinstein

El texto asociado a simulación molecular considerará la nomenclatura de Ballesteros y Weinstein ZY.XX usada en los receptores acoplados a proteína G (GPCR), donde "Z" es la abreviación de una letra de los residuos aminoacídicos, "Y" el número de la transmembrana (TM) asociada a ese aminoácido y "XX" la posición de dicho aminoácido en la TM donde el número 50 se asigna al residuo más conservado.

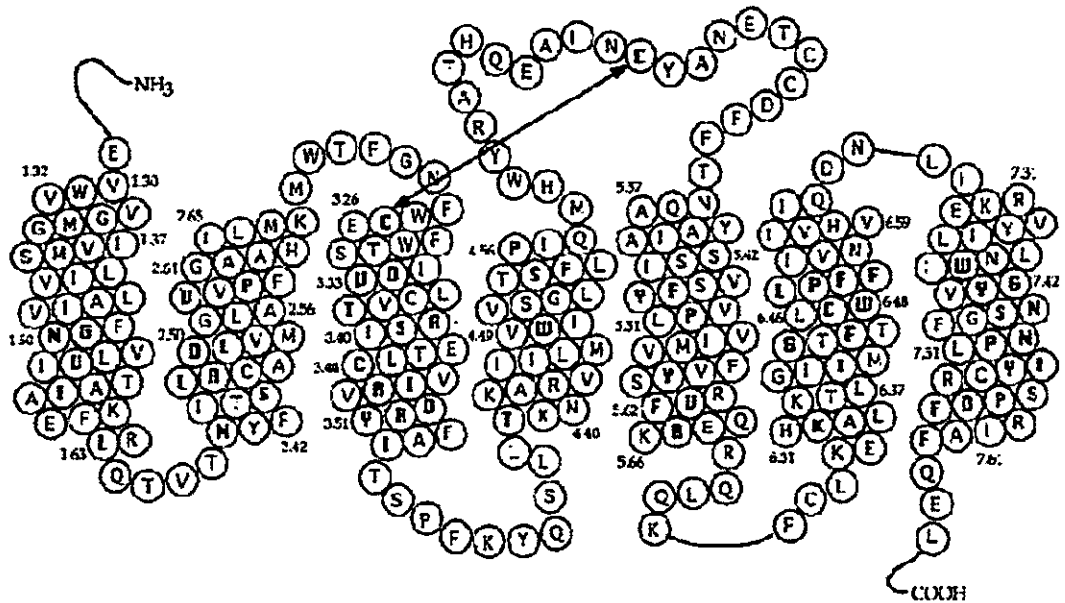
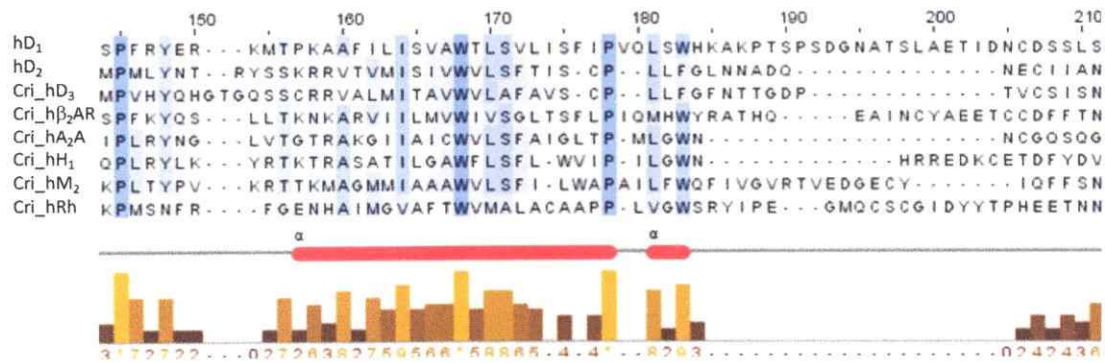
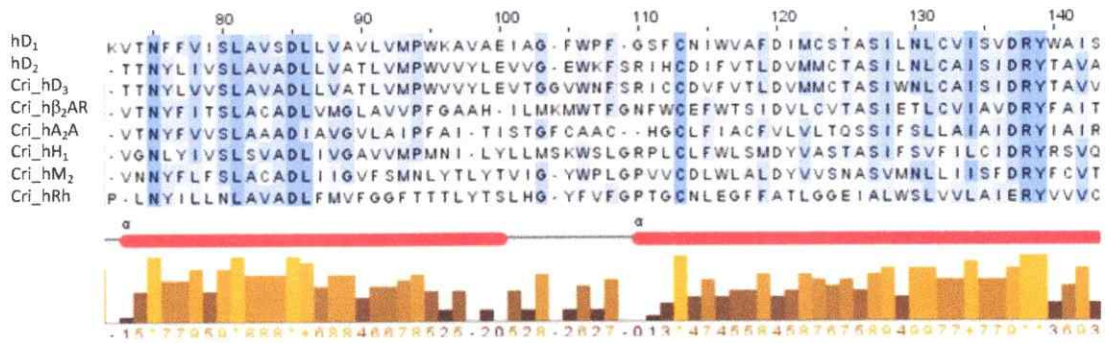
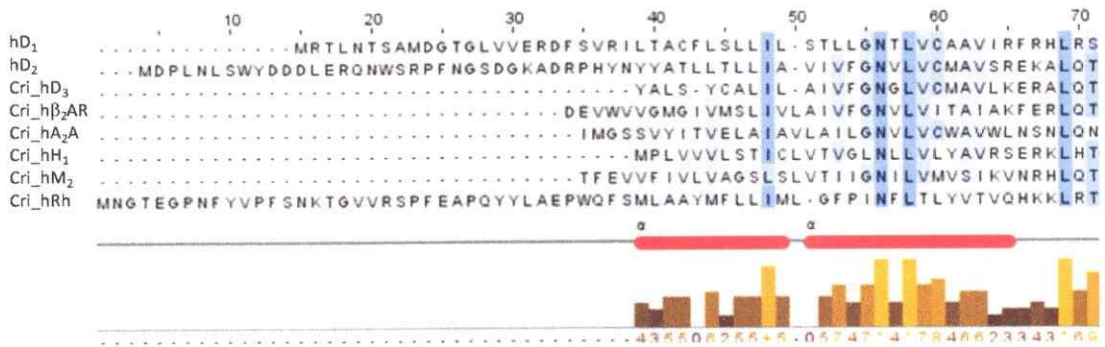


Ilustración del receptor  $\beta_2$ AR empleando la nomenclatura de Ballesteros y Weinstein, obtenida desde la publicación original (Ballesteros y Weinstein, 1995).

**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*

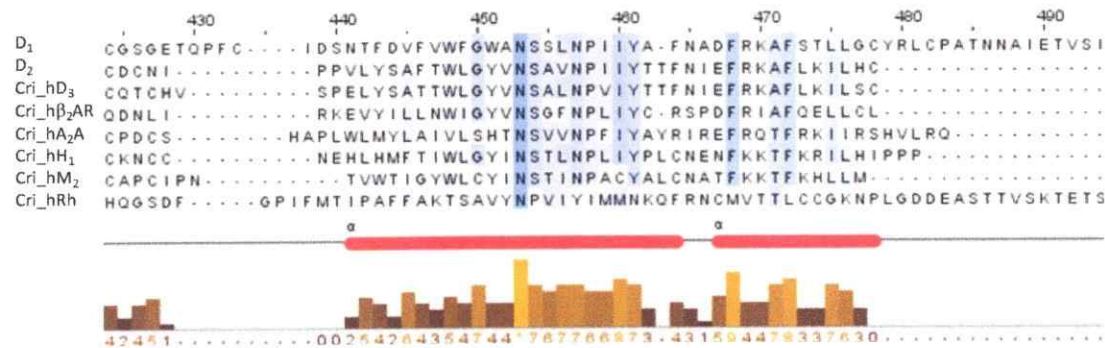
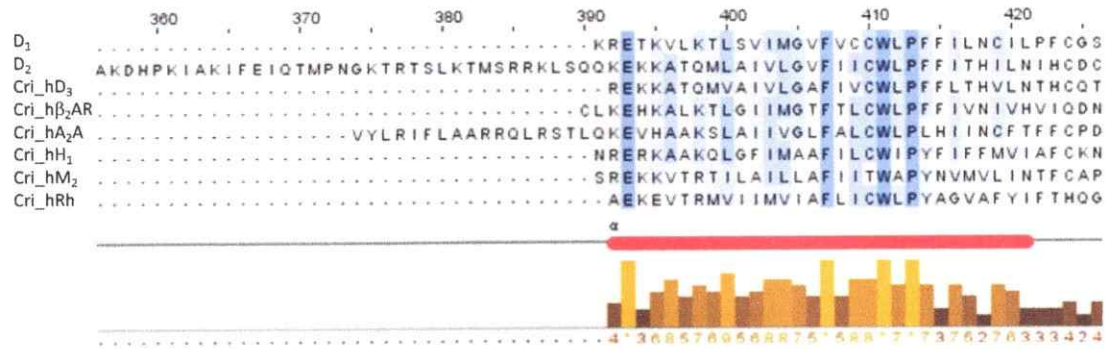
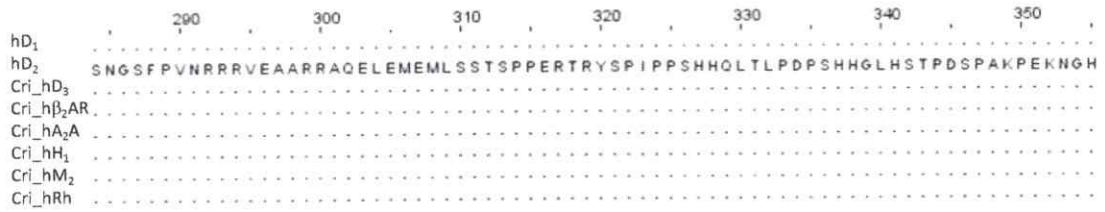
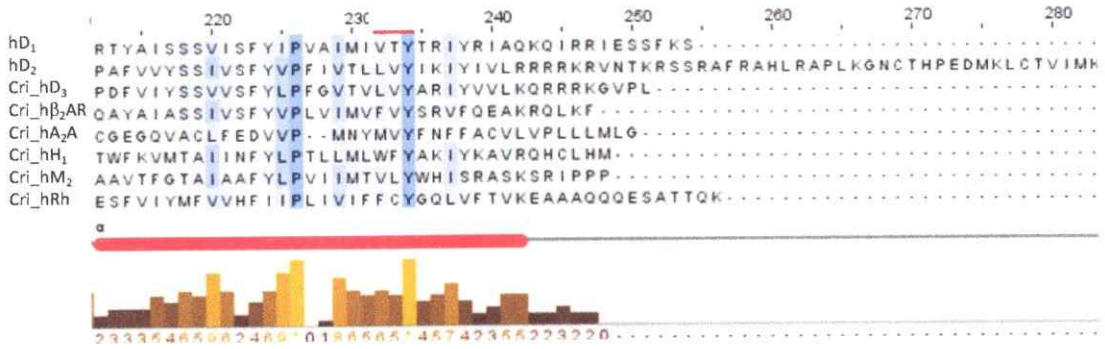
Alineamiento de secuencias aminoacídicas de el D<sub>1</sub> y de el D<sub>2</sub> humano y las estructuras cristalinas de: hD<sub>3</sub>, h $\beta_2$ AR, hA<sub>2</sub>A, hH<sub>1</sub>, hM<sub>2</sub> y de bRh. La coloración azul sobre las secuencias incrementa a medida que incrementa la identidad amnoacídica entre las secuencias de las diferentes especies. El grafico de barra bajo las secuencias también indica identidad aminoacídica, el cual lo representa en valores de 0 a 10, donde 10: se identifica como “\*”, indica 100% de identidad y es de color amarillo intenso. Y finalmente la línea horizontal roja bajo el alineamiento representa la estructura tridimensional de  $\alpha$ -hélice observada en la estructura cristalina del D<sub>3</sub> humano.





# ANEXO A

## Simulación Molecular



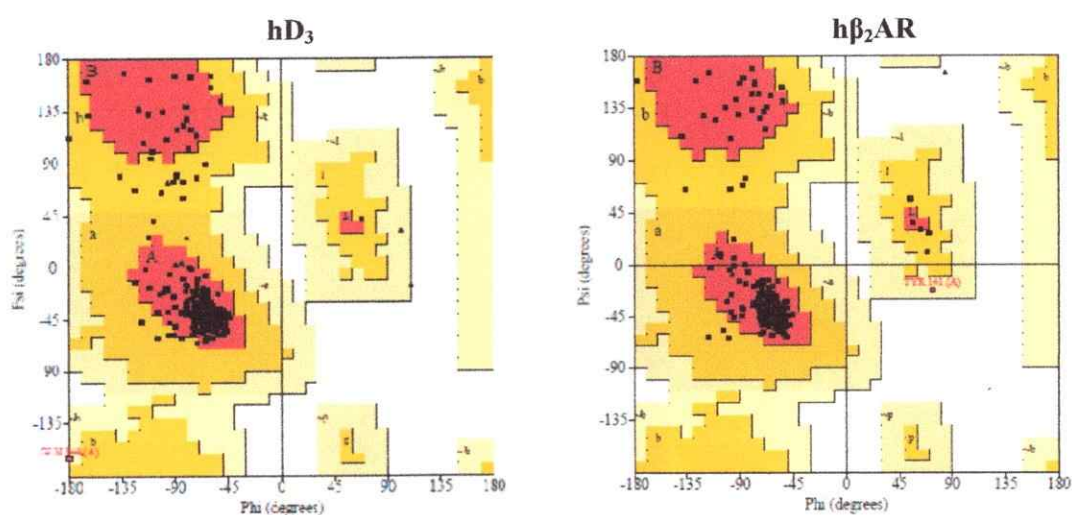
**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*

Resultado de los gráficos de Ramachandran para las estructuras cristalinas utilizadas como molde (hD<sub>3</sub> y hβ<sub>2</sub>AR) y para los 5 mejores modelos escogidos de los 200 generados a través del programa Modeller.

|                              | Nº Modelo | % / Nº de Residuos |             |                    | No favorable (%) |
|------------------------------|-----------|--------------------|-------------|--------------------|------------------|
|                              |           | A,B,L (%)          | A,b,l,p (%) | ~a, ~b, ~l, ~p (%) |                  |
| <b>hD<sub>3</sub>/247*</b>   | Cristal   | 90,3/223           | 9,3/23      | 0,4/1              | 0,0/0            |
| <b>hβ<sub>2</sub>AR/260*</b> | Cristal   | 94,2/245           | 5,4/14      | 0,4/1              | 0,0/0            |
| <b>hD<sub>1</sub>/295*</b>   | 5         | 89,2 / 263         | 8,1 / 24    | 1,4 / 4            | 1,4 / 4          |
|                              | 11        | 90,2 / 266         | 7,8 / 22    | 0,7 / 2            | 1,4 / 4          |
|                              | 26        | 89,9 / 265         | 6,8 / 20    | 1,7 / 5            | 1,7 / 5          |
|                              | 31        | 90,2 / 266         | 6,4 / 19    | 1,7 / 5            | 1,7 / 5          |
|                              | 35        | 91,2 / 269         | 7,8 / 23    | 0,0 / 0            | 1,0 / 3          |
| <b>hD<sub>2</sub>/296*</b>   | 4         | 93,2 / 276         | 6,1 / 18    | 0,3 / 1            | 0,3 / 1          |
|                              | 26        | 88,5 / 262         | 8,1 / 24    | 1,7 / 5            | 1,7 / 5          |
|                              | 64        | 92,6 / 274         | 6,1 / 18    | 0,7 / 2            | 0,7 / 2          |
|                              | 105       | 90,9 / 269         | 7,4 / 22    | 1,4 / 4            | 0,3 / 1          |
|                              | 166       | 89,2 / 264         | 9,5 / 28    | 1,0 / 3            | 0,3 / 1          |

\*Nº de aminoácidos analizados de cada proteína en los cuales se excluye glicina y prolina.

Gráficos de Ramachandran de las estructuras cristalinas del hD<sub>3</sub> y del hβ<sub>2</sub>AR.

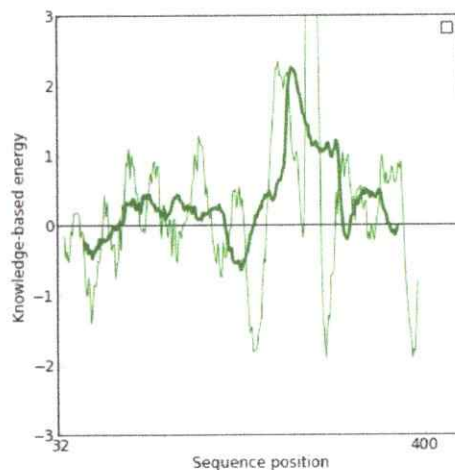
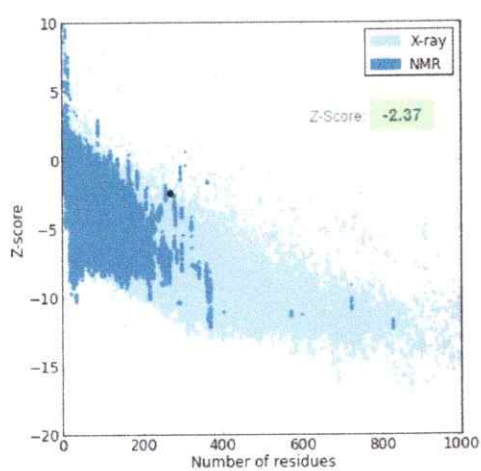


## ANEXO A

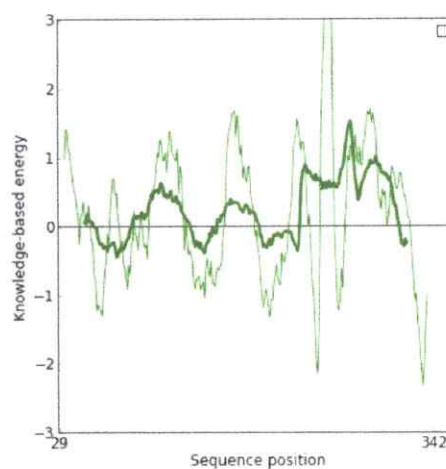
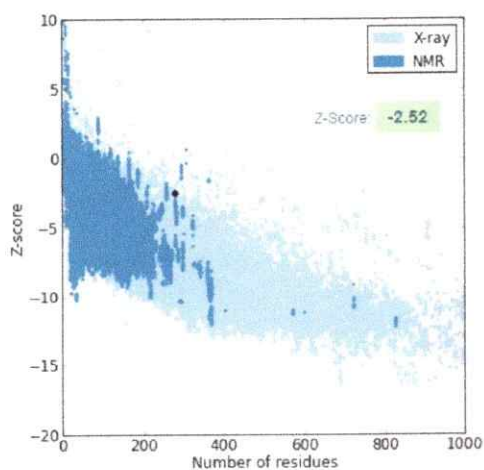
### Simulación Molecular

Gráficos obtenidos del sitio de red ProSa: (a) hD<sub>3</sub> y b) hβ<sub>2</sub>AR. Los gráficos ubicados a la derecha representan los valores de Z-score calculados a partir de la base de datos de estructuras cristalina (azul claro) y RMN (azul oscuro) y como punto negro el valor obtenido para los receptores hD<sub>3</sub> y hβ<sub>2</sub>AR. Los gráficos ubicados a la derecha son referentes a “Knowledge-based energy”; en verde claro valores cada 20 aminoácidos y en verde oscuro valores cada 40 aminoácidos.

(a) hD<sub>3</sub>



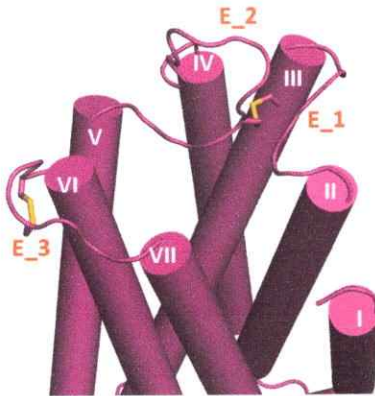
(b) hβ<sub>2</sub>AR



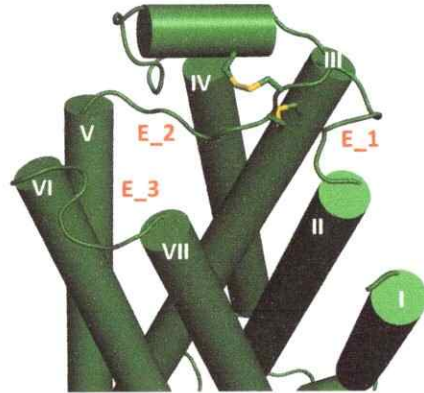
ANEXO A  
*Simulación Molecular*

Puentes disulfuros extracelulares en diferentes estructuras cristalinas de GPCR: (a) hD<sub>3</sub>, (b) hβ<sub>2</sub>AR, (c) hA<sub>2</sub>A, (d) hM<sub>2</sub> y (e) hH<sub>1</sub>. El puente disulfuro en cada caso es señalado en amarillo.

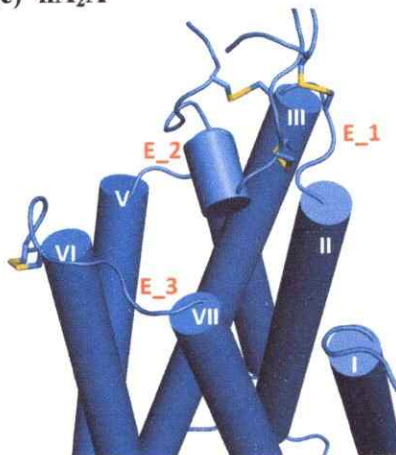
(a) hD<sub>3</sub>



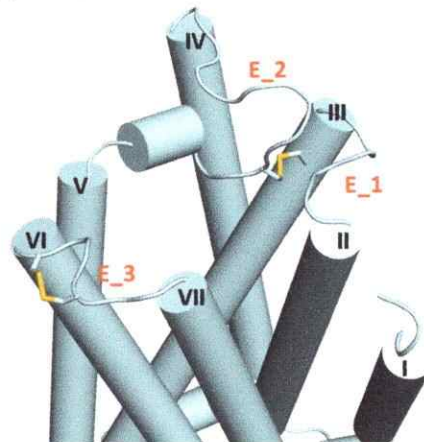
(b) hβ<sub>2</sub>AR



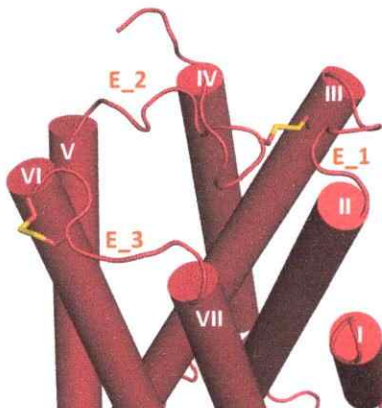
(c) hA<sub>2</sub>A



(d) hM<sub>2</sub>

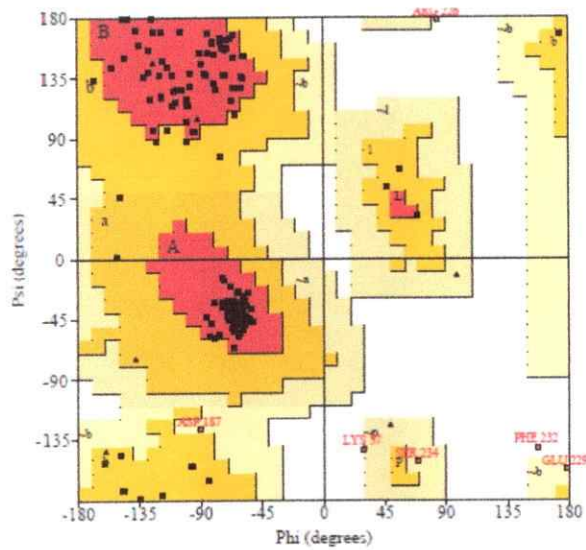


(e) hH<sub>1</sub>



**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*

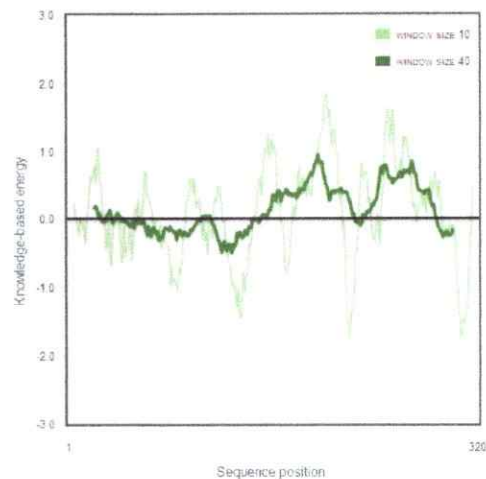
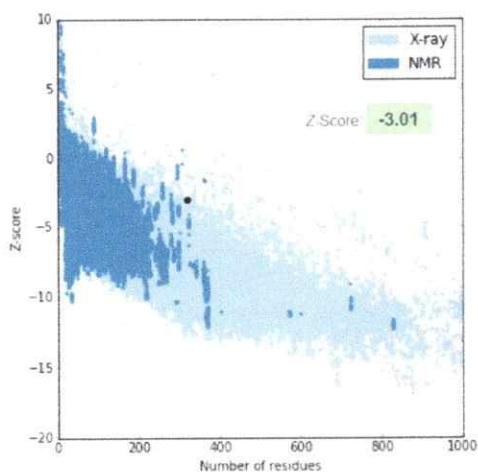
Gráfico de Ramachandran del modelo hD1\_2SS



Resumen resultados de gráfico de Ramachandran del modelo de hD1\_2SS

|                      | %/N° de Residuos |             |                    |                  |
|----------------------|------------------|-------------|--------------------|------------------|
|                      | A,B,L (%)        | A,b,l,p (%) | ~a, ~b, ~l, ~p (%) | No favorable (%) |
| <b>hD1_2SS (295)</b> | 91,2/269         | 6,8/20      | 1,0/3              | 1,0/3            |

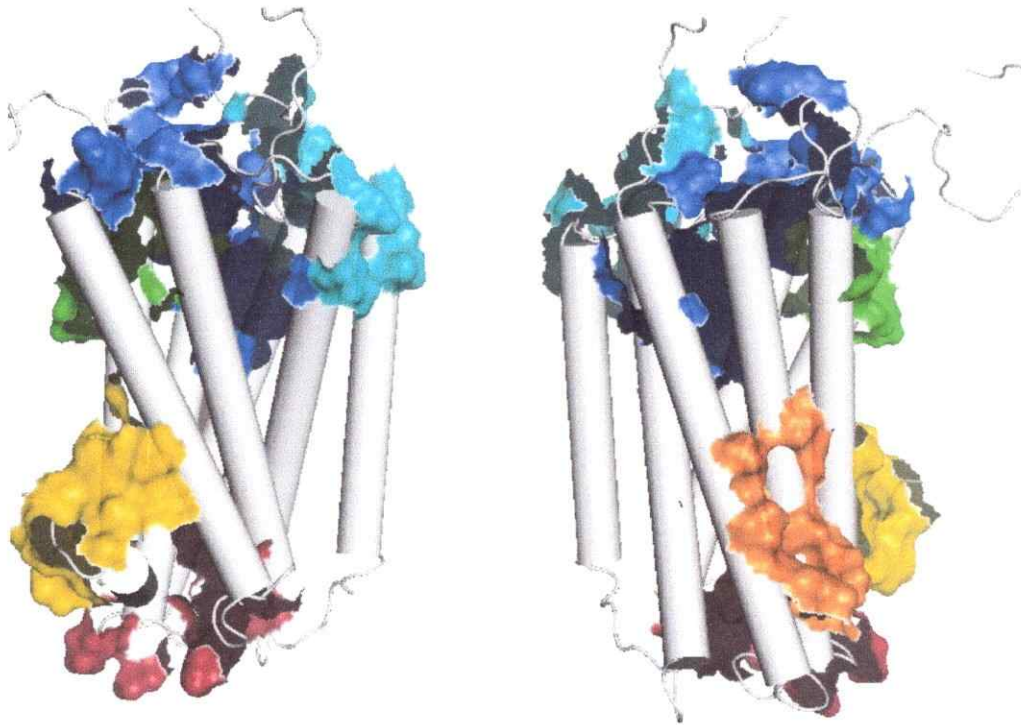
Gráficos obtenidos del sitio de red ProSa para el modelo de hD1\_2SS. Para la simbología ver p. 176 en este mismo anexo.









**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*

Bolsillos propuestos por el programa ICM\_pro. Los residuos están simbolizados con su nombre abreviado en una letra y el número que acompaña a cada residuo representa el número en la secuencia aminoacídica.

**Modelo del hD<sub>1</sub>.**








| Nº Bolsillo | Color   | Residuos  |
|-------------|---|---|
| 1           |  | D19, S21, R23, T26, K81, A84, A87, F89, W99, V100, D103, I104, S107, T108, S172, C186, L190, Y194, A195, S198, S199, S202, W255, F258, F259, N262, L265, T273, F276, D279, S280, F283, D284, V287, W291 |
| 2           |  | S36, L39, G40, L43, S295, P298, I299, A302, R308, F311, S312, L315, Y318, R319  |
| 3           |  | H53, L54, S56, T59, N60, V63, R121, Y131, S230, K233, R236, V240, L244, Y301, N304, F307  |
| 4           |  | G93, S94, C96, I98, V100, Q160, S162, H164, A166, P168, T169, N185, S189  |
| 5           |  | M210, I211, Y214, T215, Y218, T238, L241, K242, S245, M248, G249, V252  |
| 6           |  | T26, F29, L30, K81, E85, D284, V285, W288   |

**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*

**Modelo del hD<sub>2</sub>.**



| Nº Bolsillo | Color   | Residuos   |
|-------------|---|--|
| 1           |  | L41, V91, L94, E95, F110, V111, D114, V115, C118, I183, I184, F189, V190, S193, S194, S197, W260, F263, F264, H267, I268, Y282, S283, T286, W287, Y290 |
| 2           |  | V136, M140, V215, L216, R218, R220, R222, N224   |
| 3           |  | A64, L65, T67, T69, N70, R132, Y142, K226, S229, K241, E242, K244, A245, M248, N304, E306, F307  |
| 4           |  | T67, T68, D131, T134, L141, Y142, R145, Y146, S148, R151, M155, R227   |
| 5           |  | I183, H267, N270, I27, D274, C275, I277, P279, Y282  |

ANEXO A  
Simulación Molecular

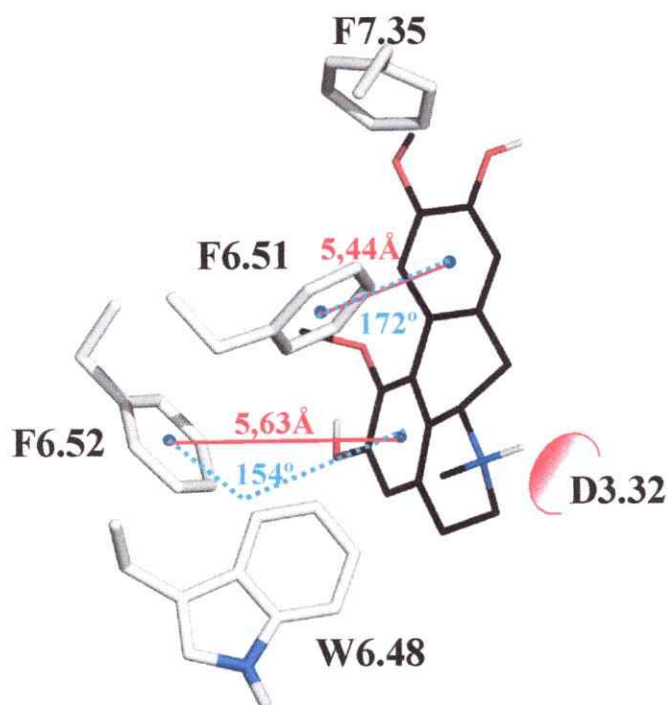


Figura A. Bolsillo aromático alrededor de boldina en la posición 1.

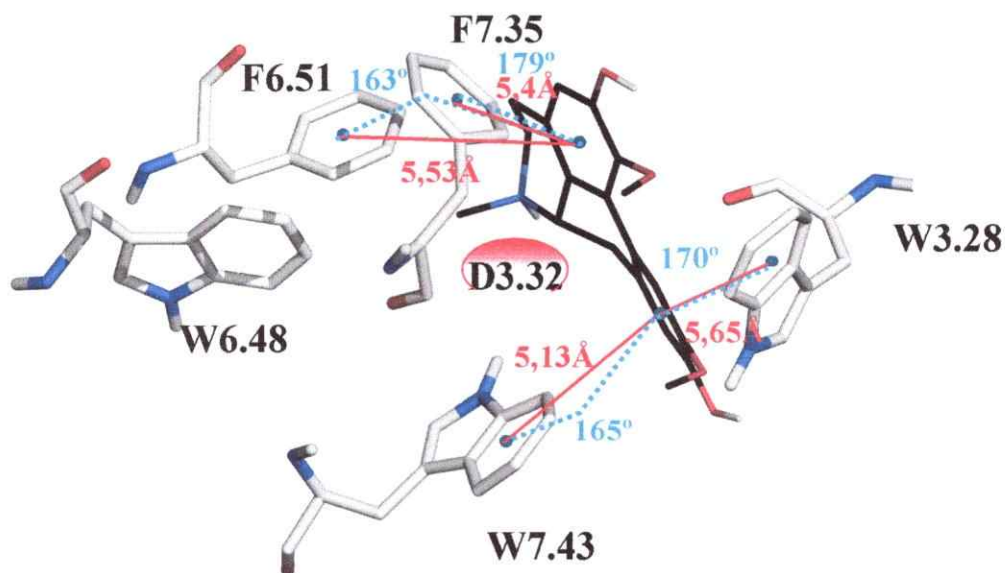
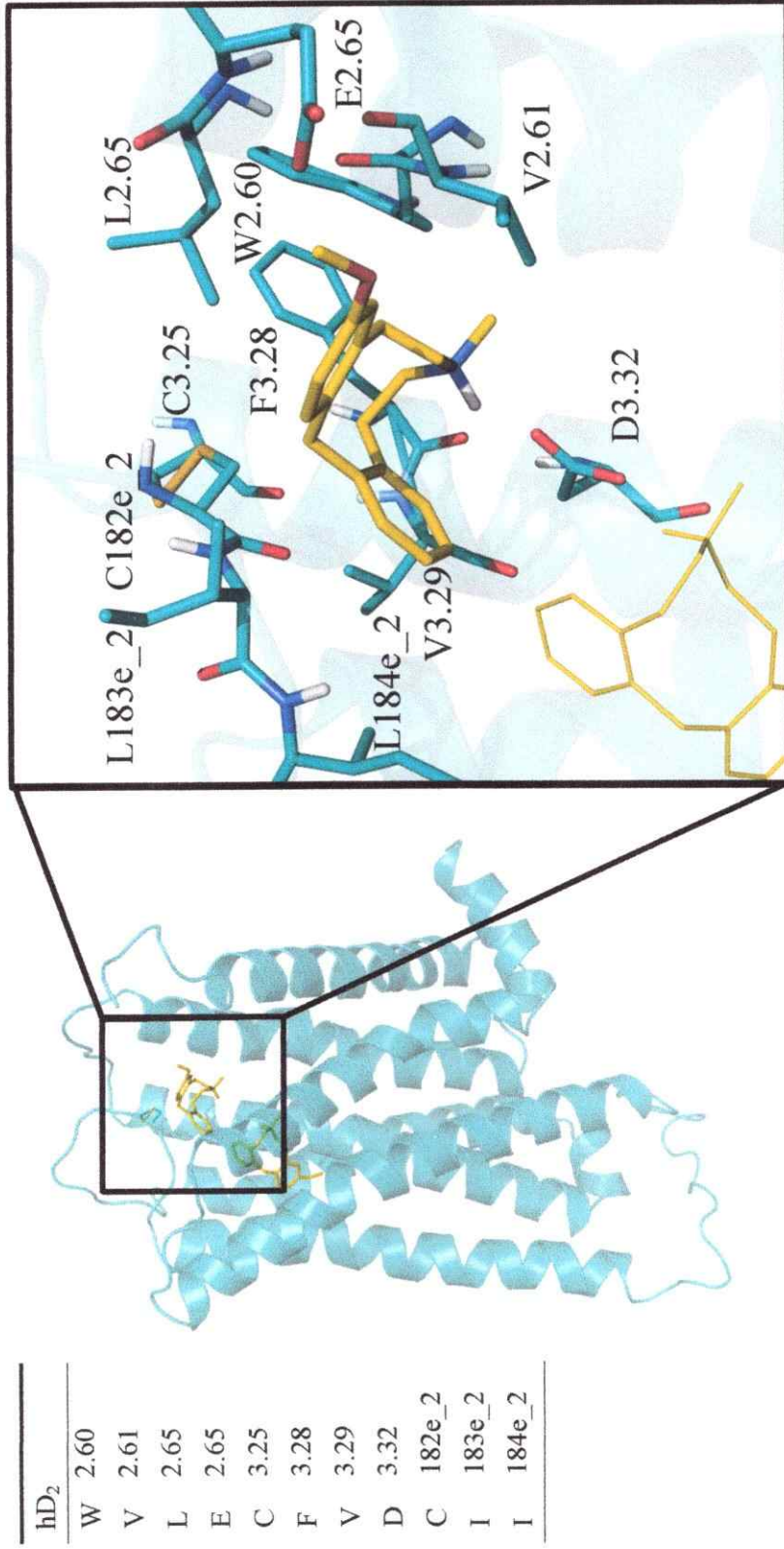


Figura B. Bolsillo aromático alrededor de boldina en la posición 2.



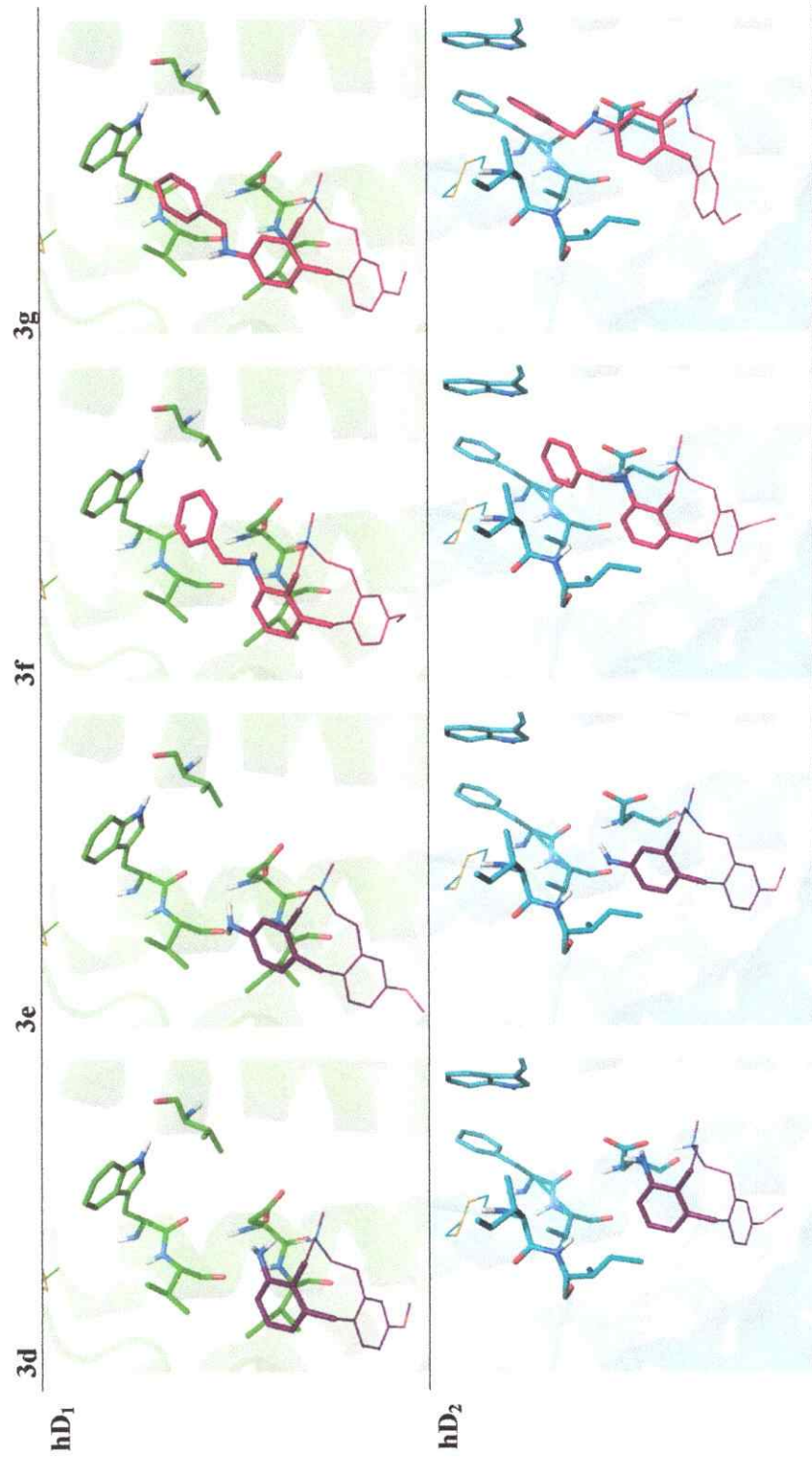
**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*



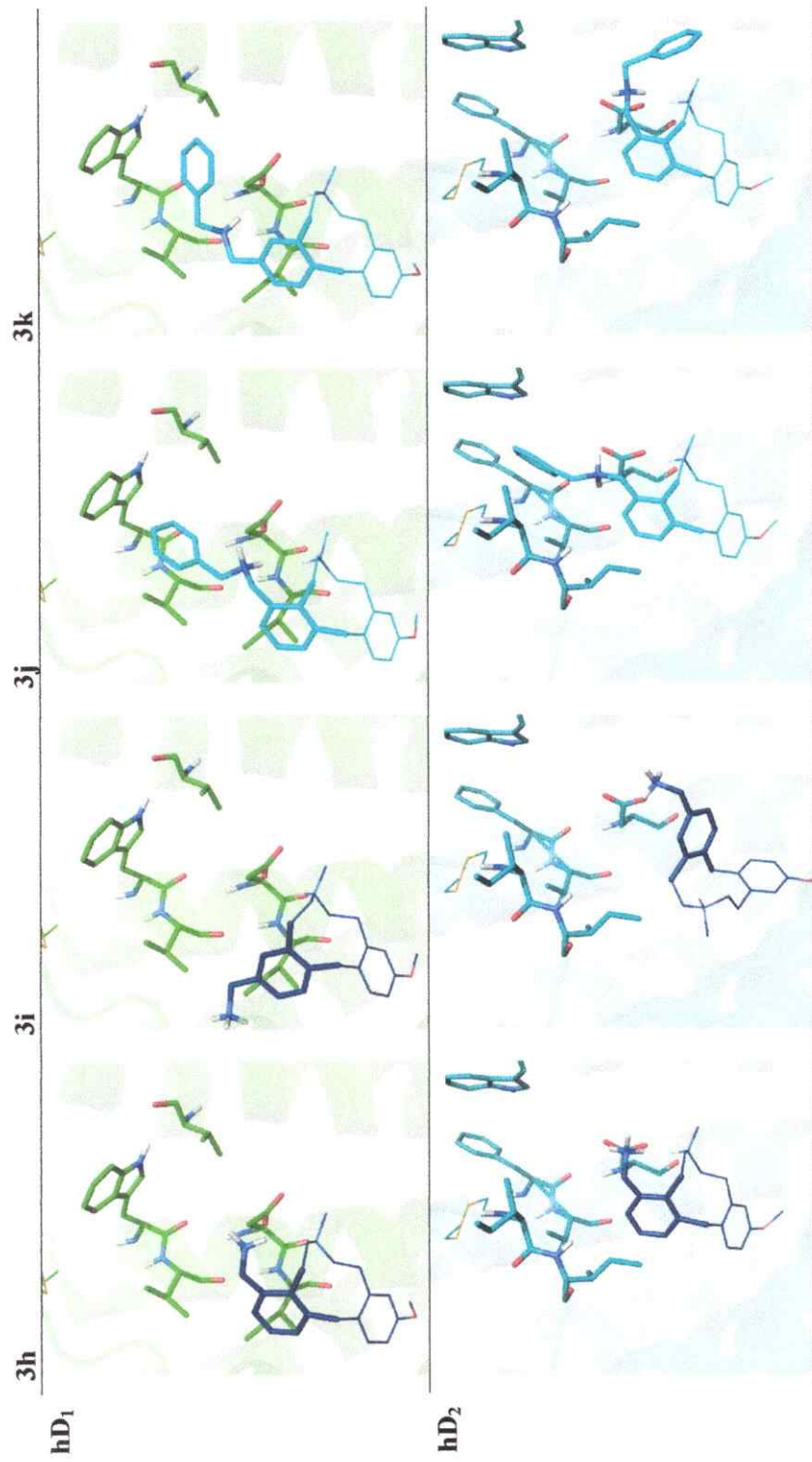
Con enlaces gruesos y amarillos se muestra la segunda conformación observada en acoplamiento molecular del complejo hD<sub>2</sub> con 3MOD

**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*

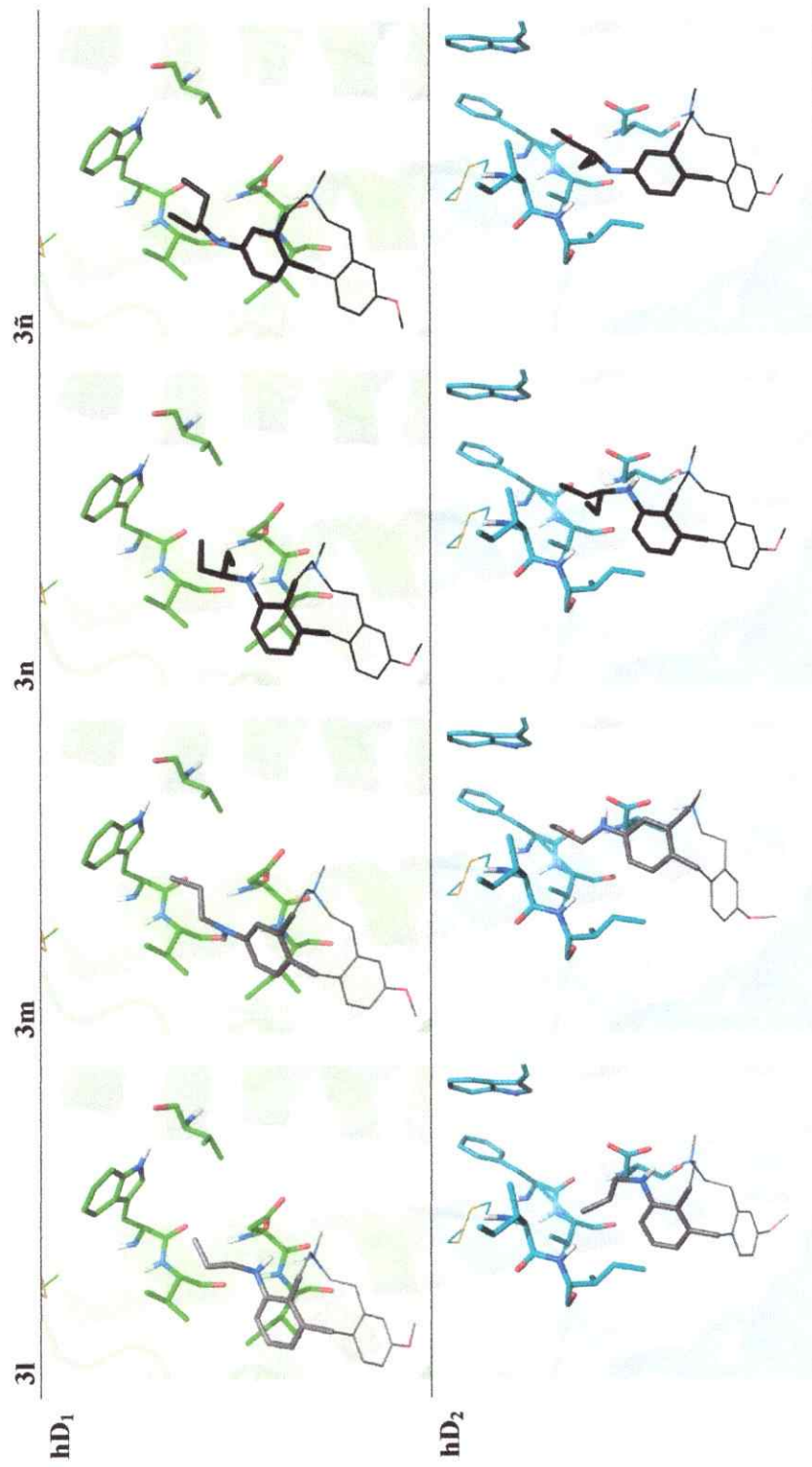
Conjunto completo de conformaciones y posiciones obtenidas del acoplamiento molecular de los derivados de 3MOD



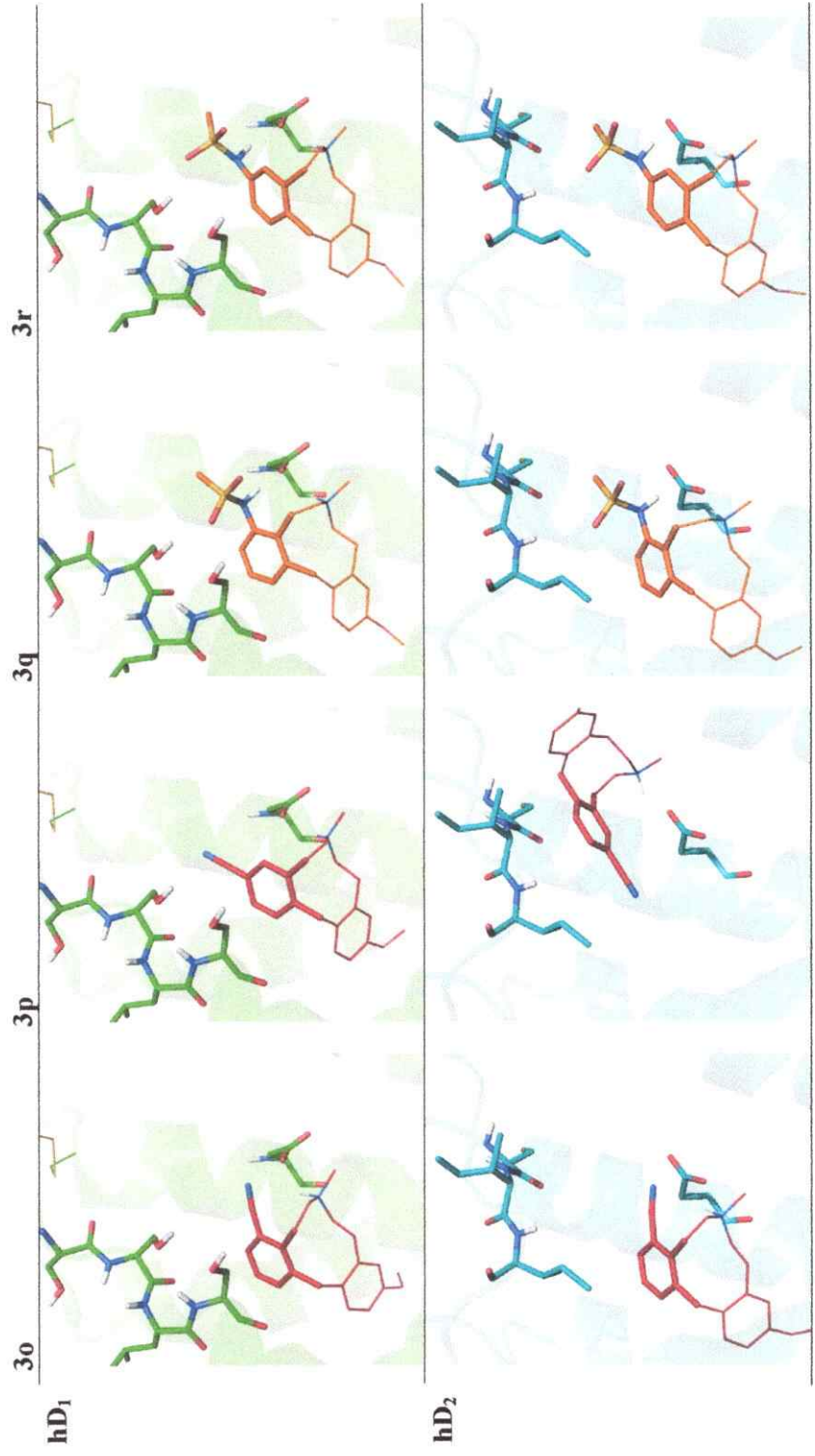
**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*



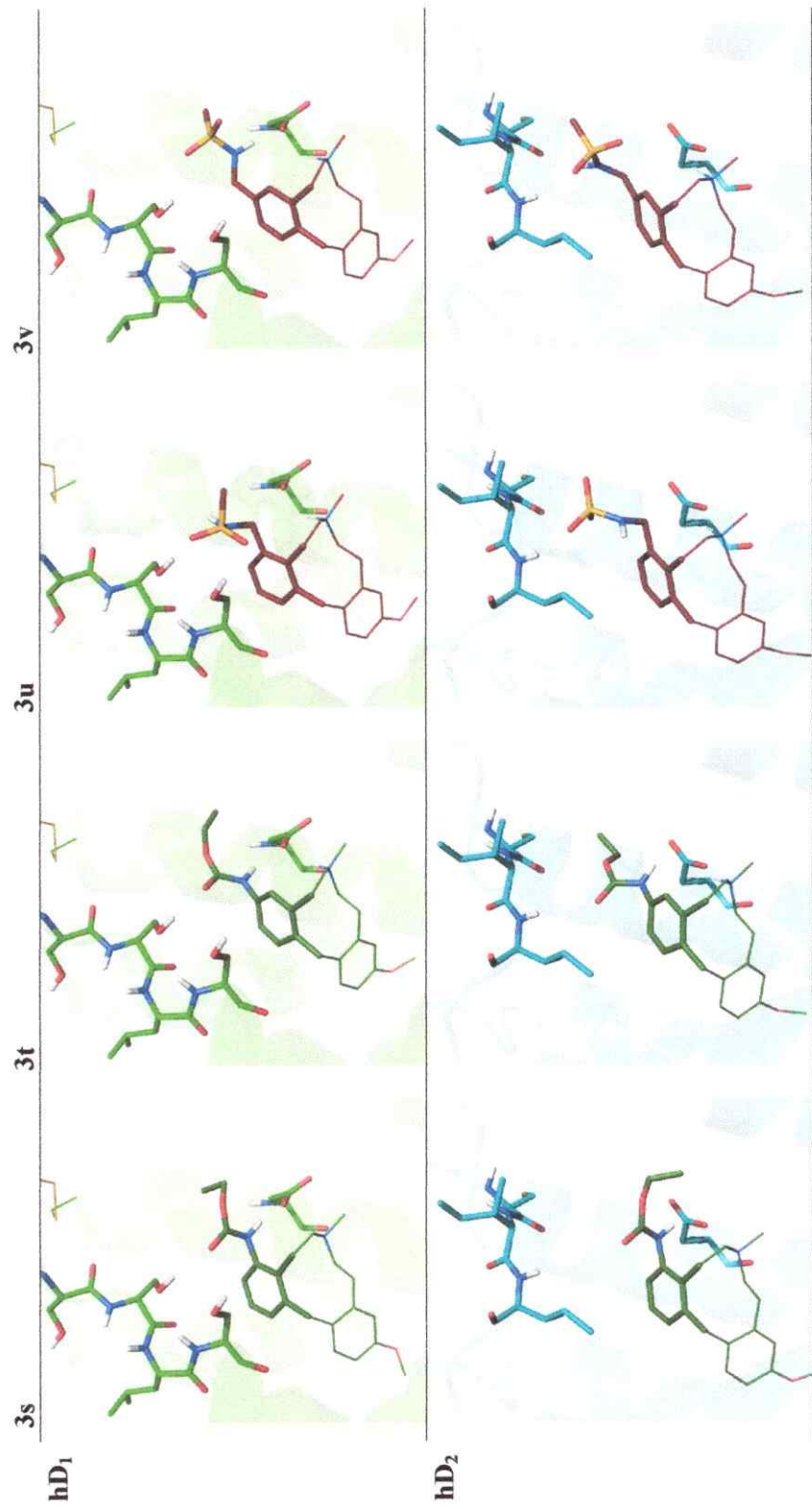
**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*



**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*

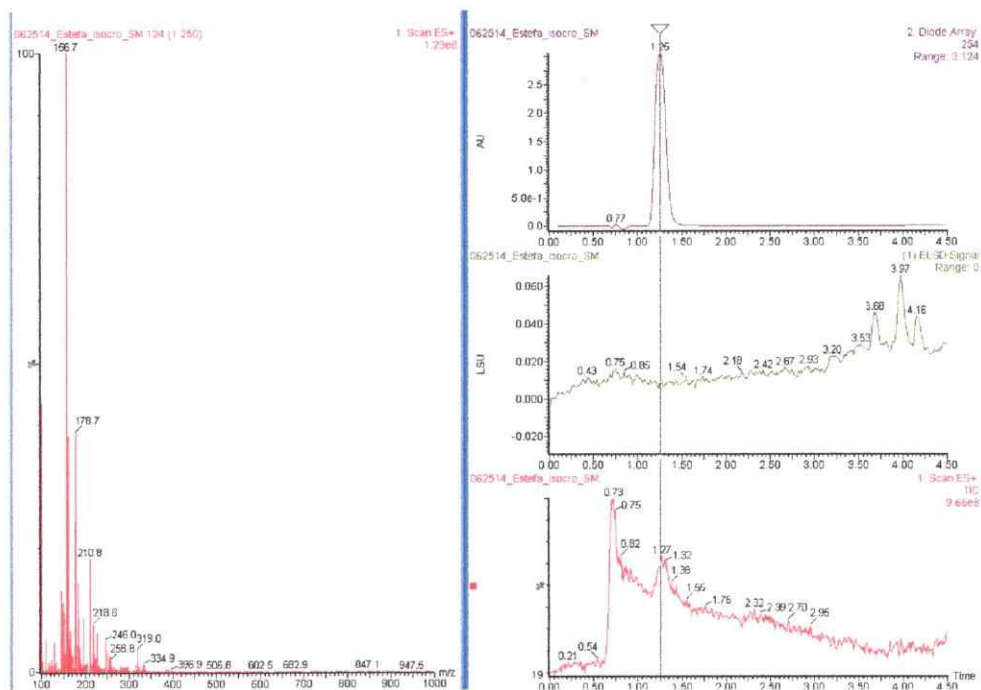
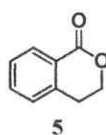
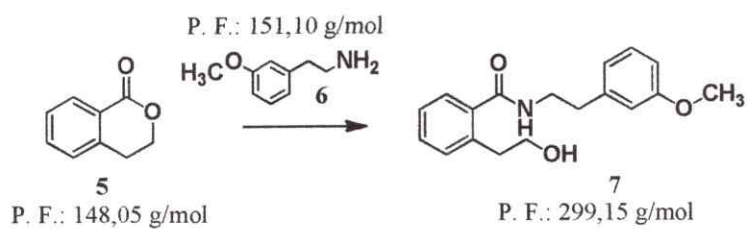


**ANEXO A**  
*Simulación Molecular*

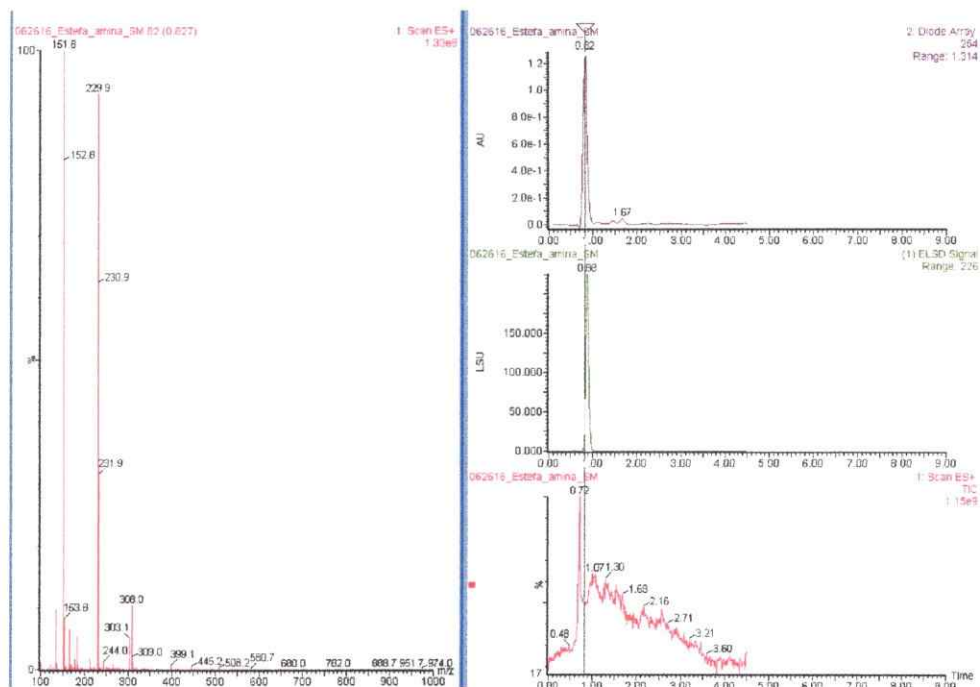
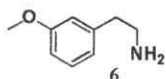


## ANEXO B

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa

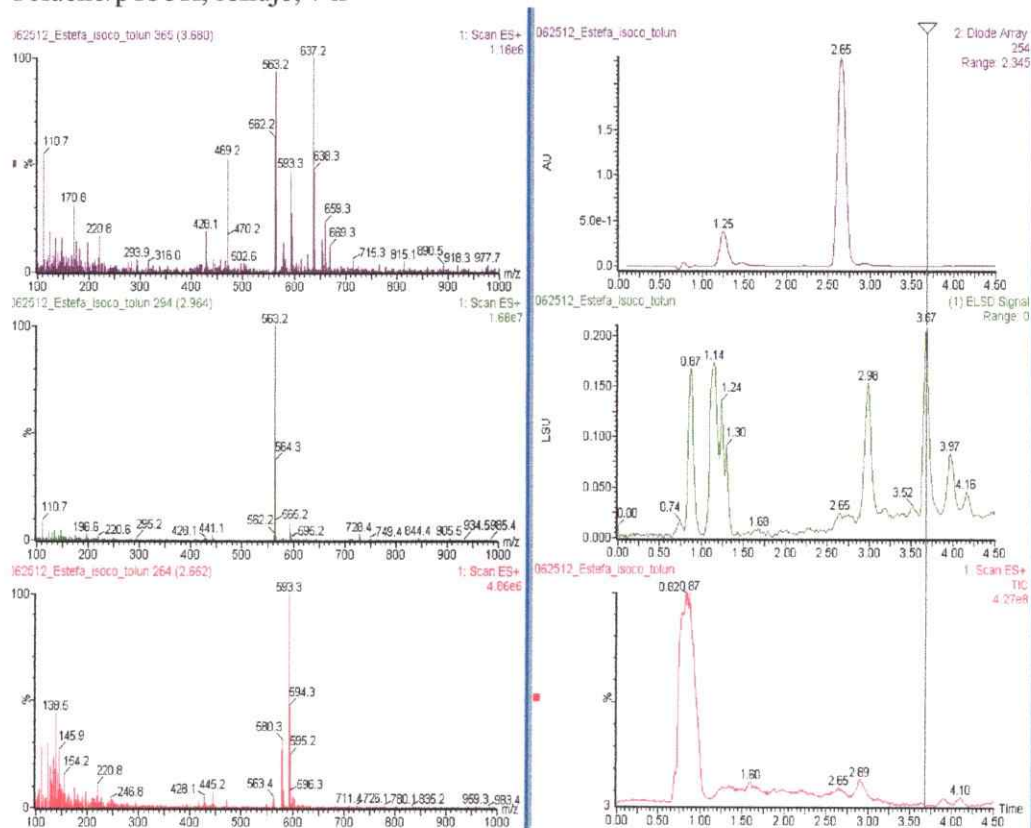


**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica \_Espectrometría de masa*



**Ensayo**

**I** Tolueno/pTsOH, reflujo, 7 h

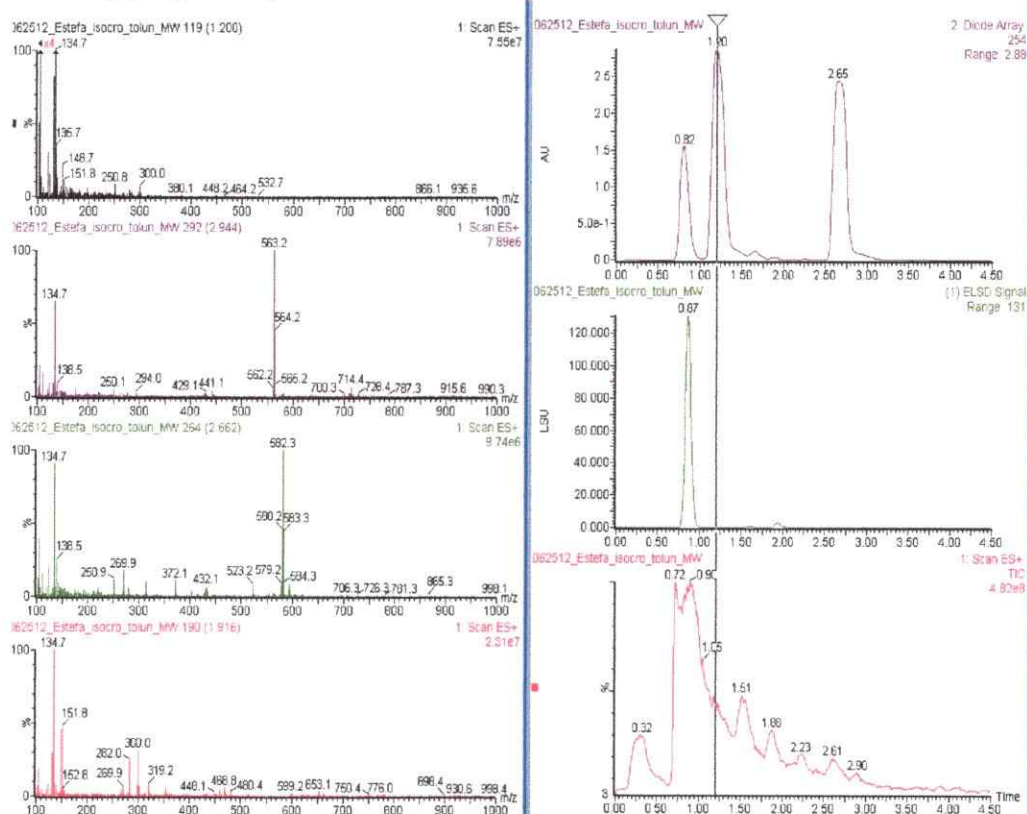




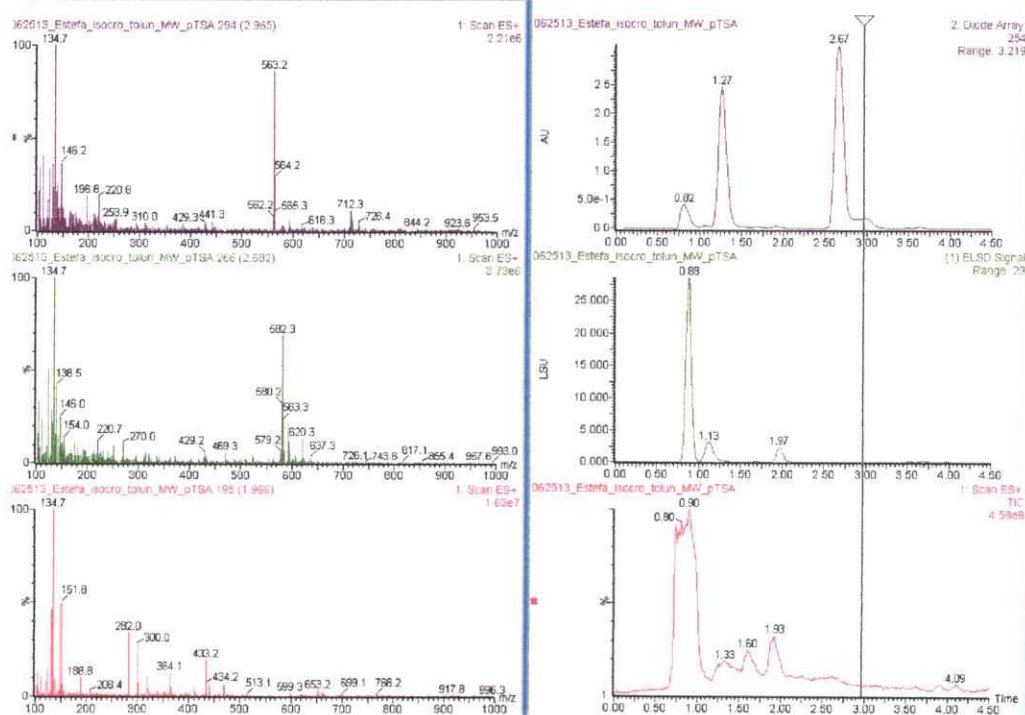
## ANEXO B

### Síntesis Orgánica \_Espectrometría de masa

#### II Tolueno, $\mu$ W, 180 °C, 1 h

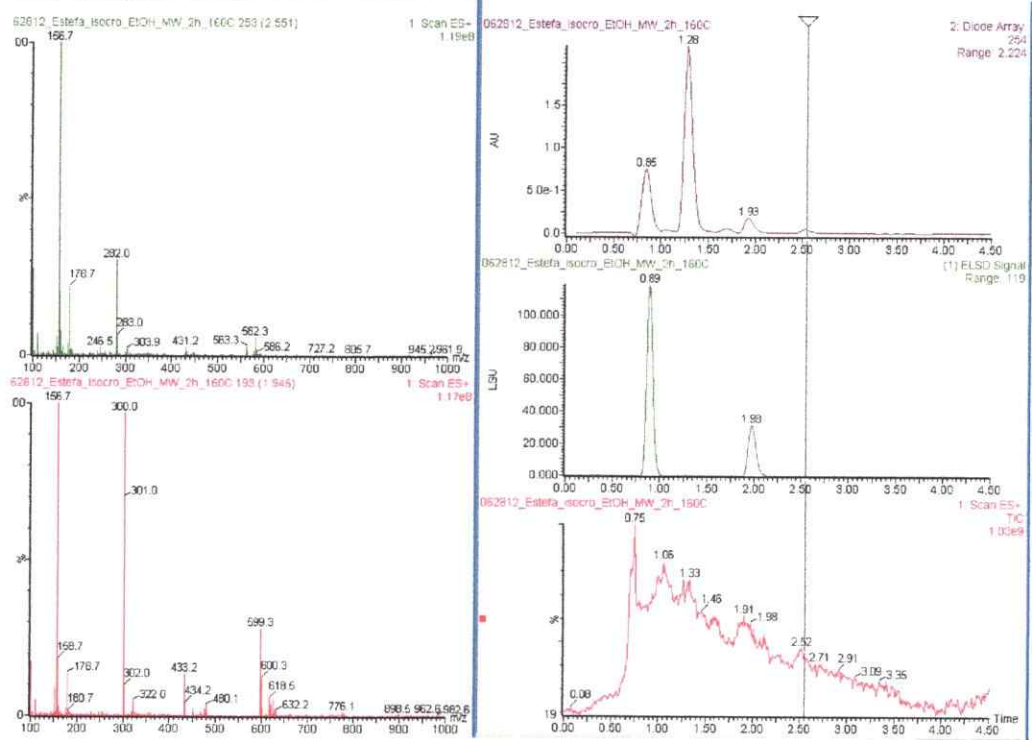


#### III Tolueno/pTsOH, $\mu$ W, 180 °C, 7 h

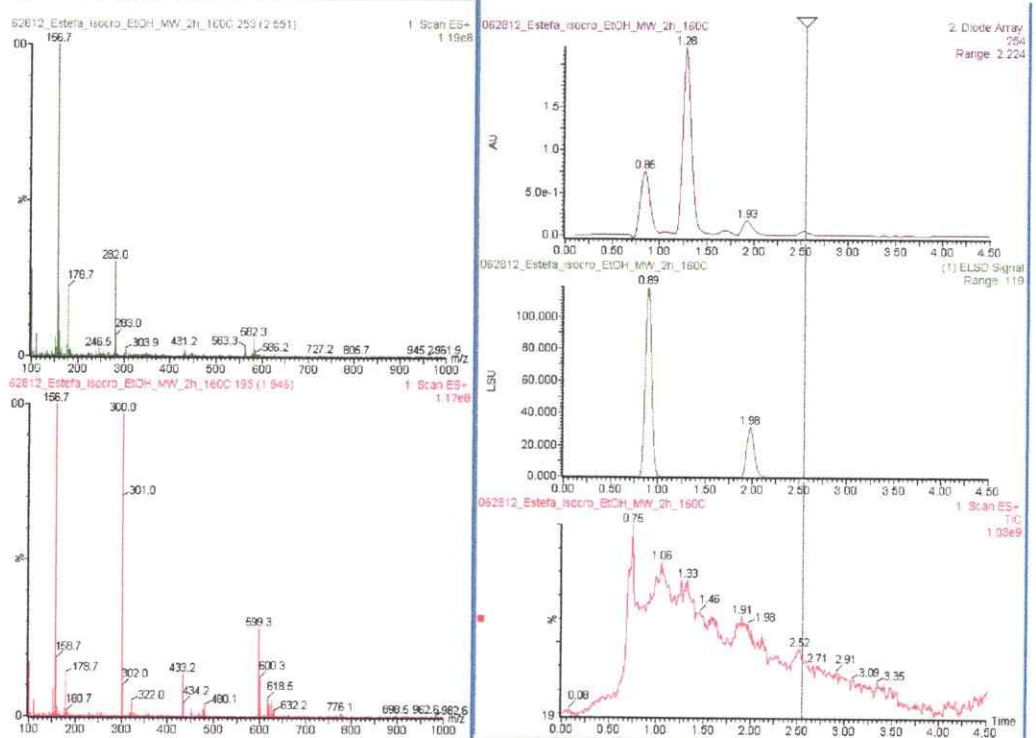


**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa*

**IV** EtOH(cat), reflujo, 24 h

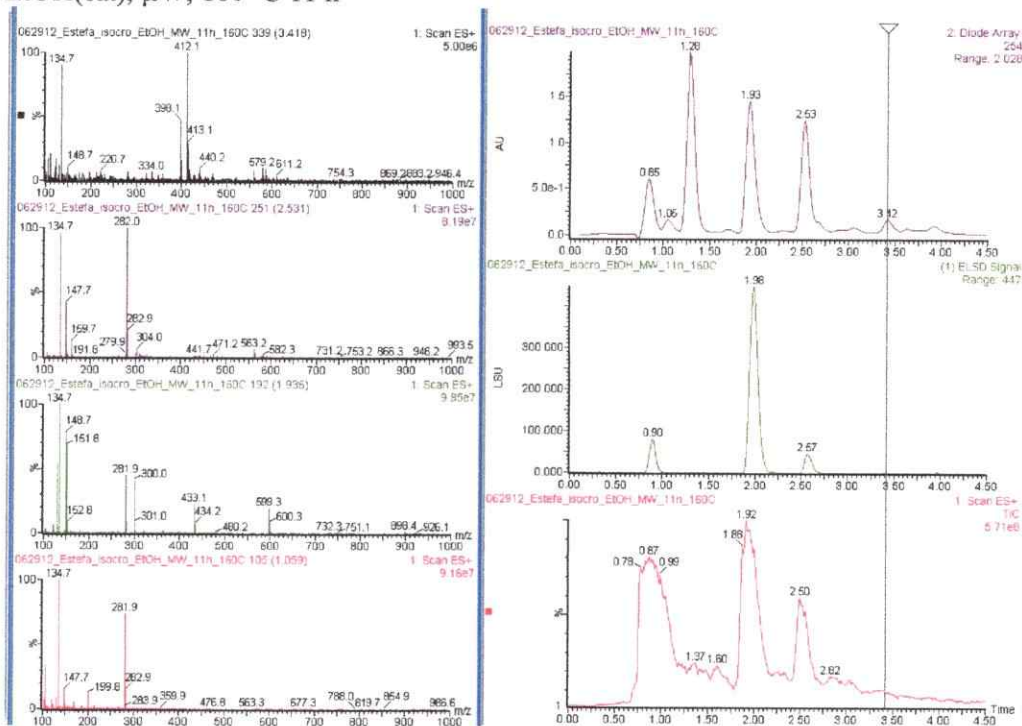


**V** EtOH(cat),  $\mu$ W, 160 °C 2 h

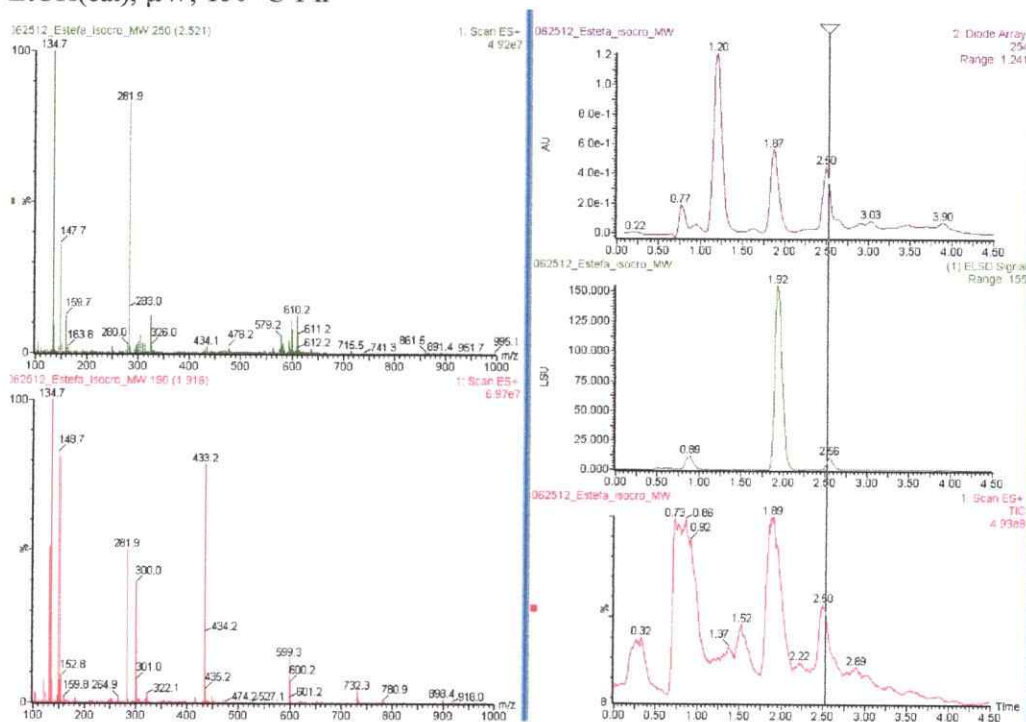


**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica Espectrometría de masa*

**VI** EtOH(cat),  $\mu$ W, 160 °C 11 h



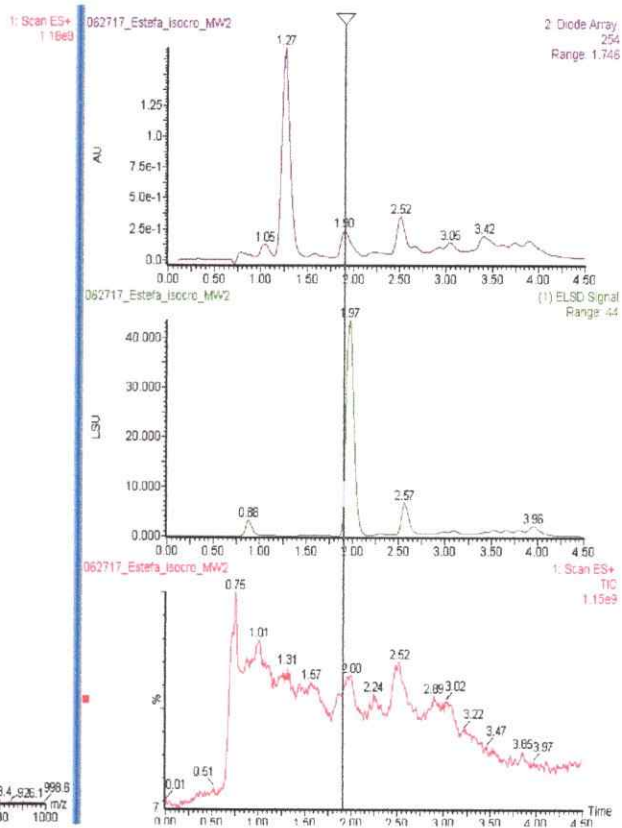
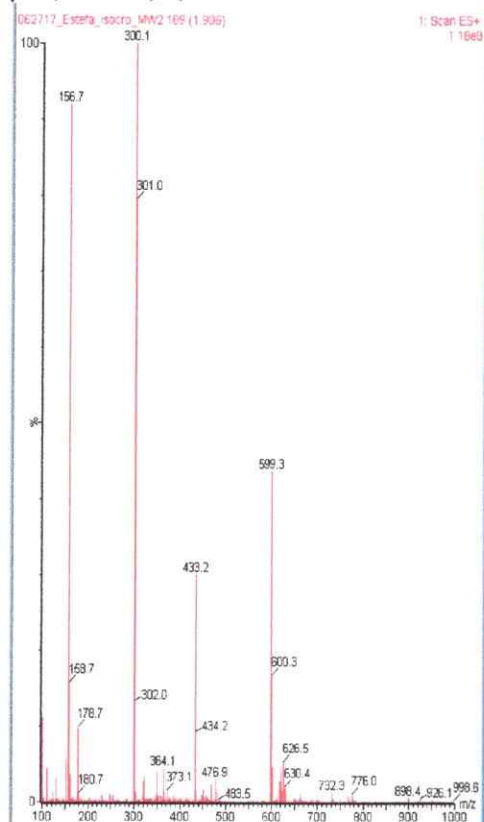
**VII** EtOH(cat),  $\mu$ W, 150 °C 1 h



ANEXO B  
Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa

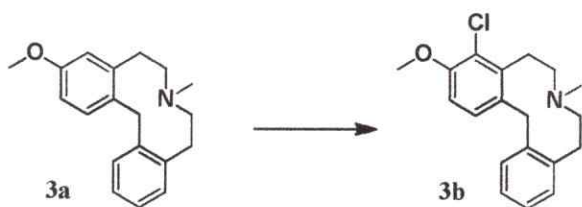
VIII

$\mu$ W, 200 °C, 0,5 h



## ANEXO B

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa

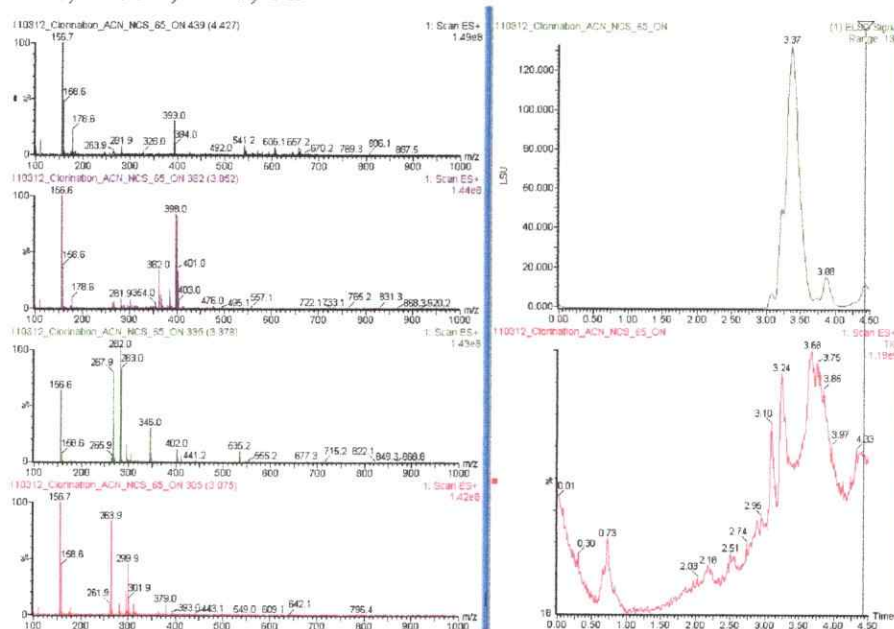


P. F.: 281,18 g/mol

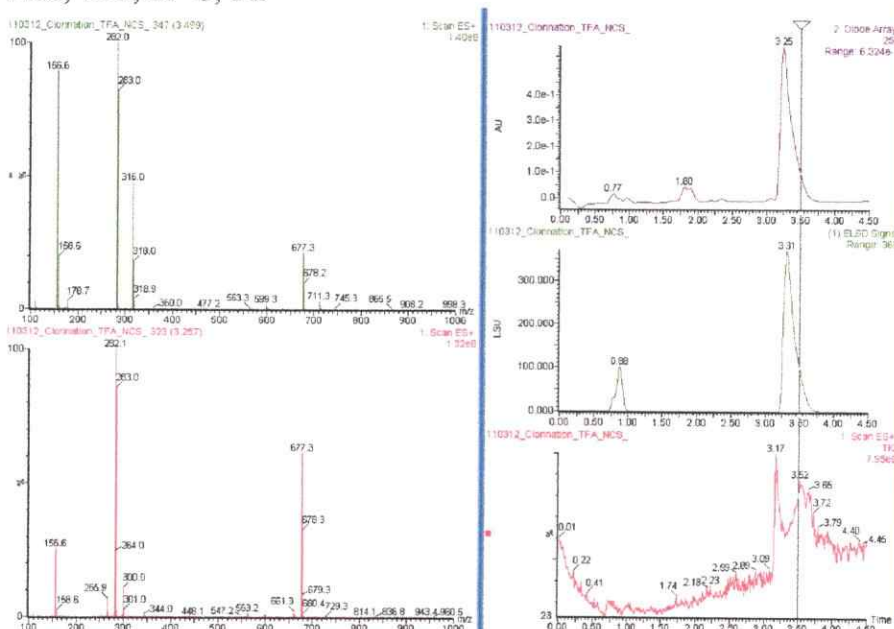
P. F.: 315,14 g/mol

### Ensayo

#### I NCS, MeCN, 60 °C, 1 h

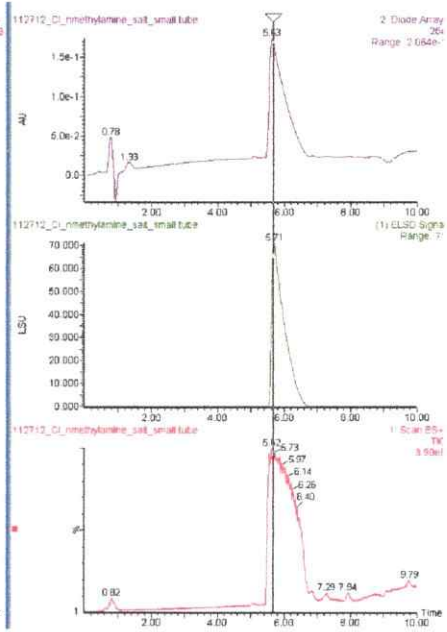
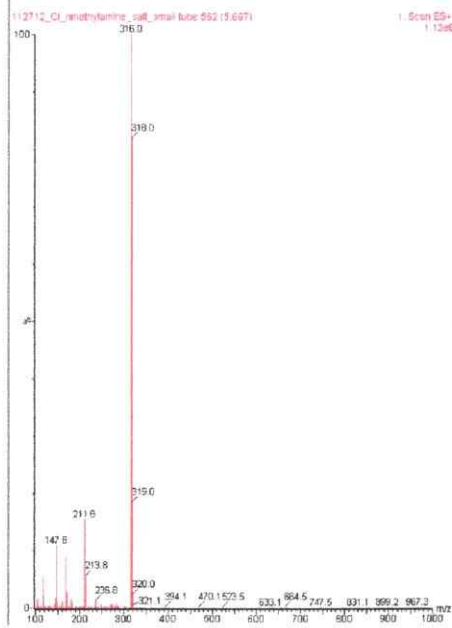


#### II NCS, TFA, 25 °C, 1 h

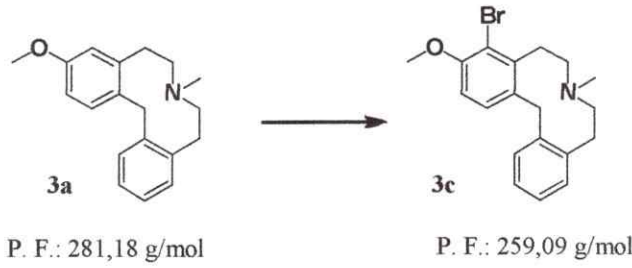


ANEXO B  
Sintesis Orgánica \_Espectrometría de masa

III SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, 25 °C, 2 h



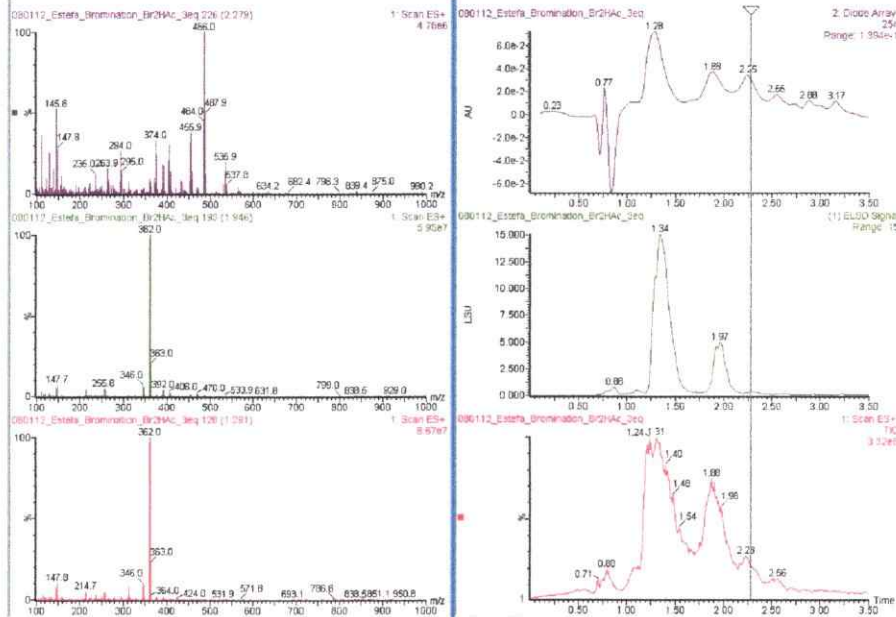
**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa*



**Entrada**

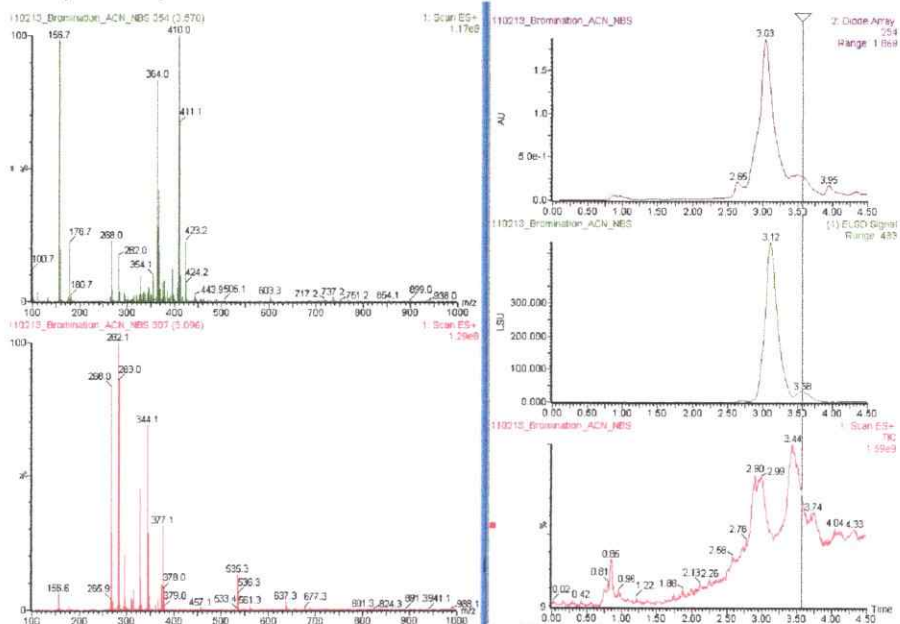
**I**

Br<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, 25 °C



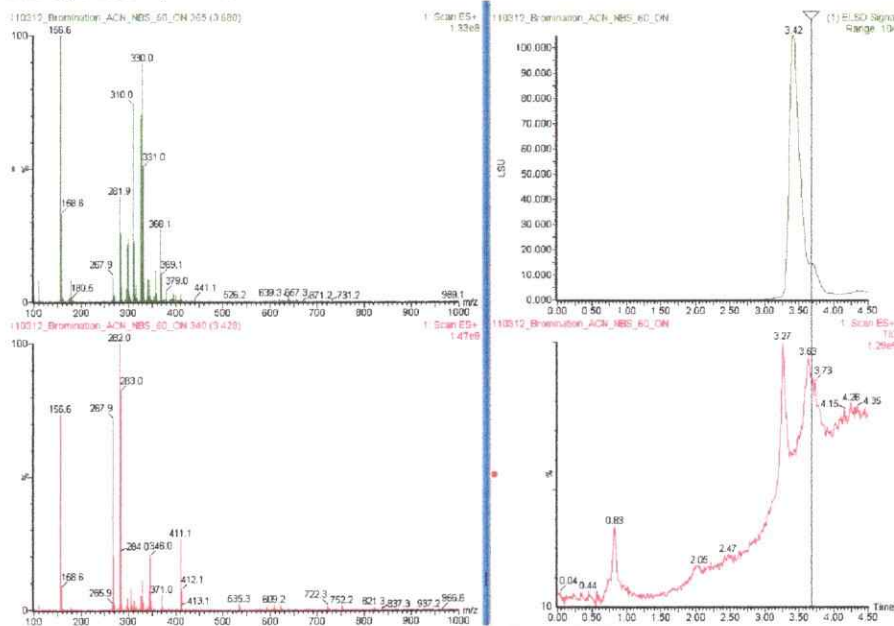
**II**

NBS, MeCN, 25 °C

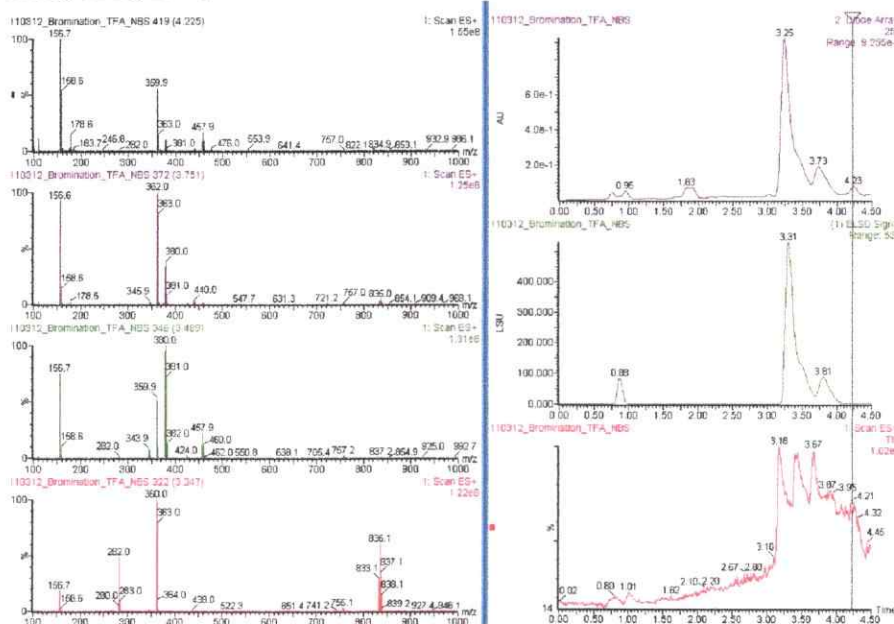


**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa*

**III** NBS, MeCN, 60 °C



**IV** NBS, TFA, 25 °C

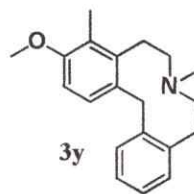
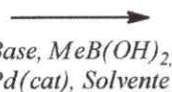




**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa*



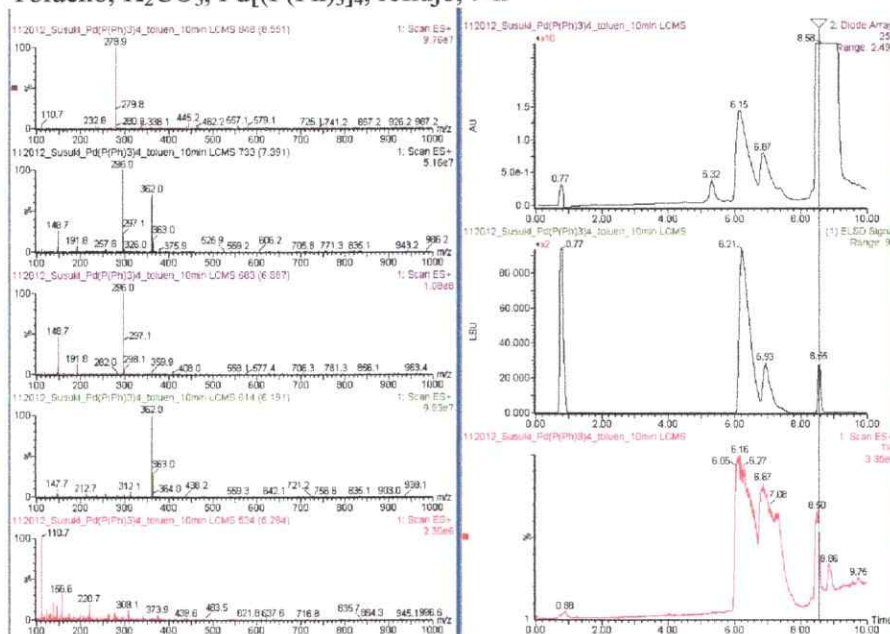
P.F.: 359,09 g/mol



P.M.: 295,19 g/mol

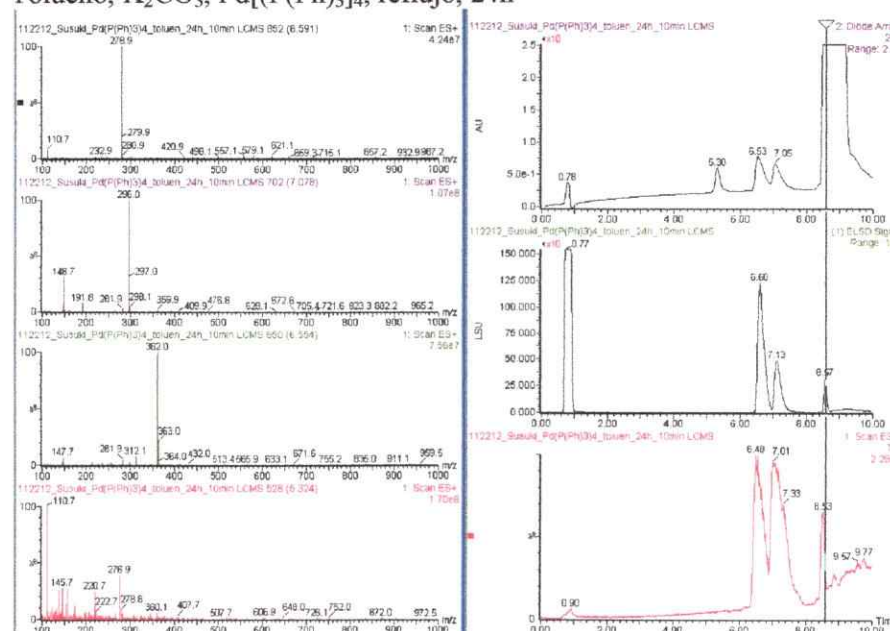
**Entrada**  
**Ia**

Tolueno,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}[(\text{P}(\text{Ph})_3)_4]$ , reflujo, 9 h



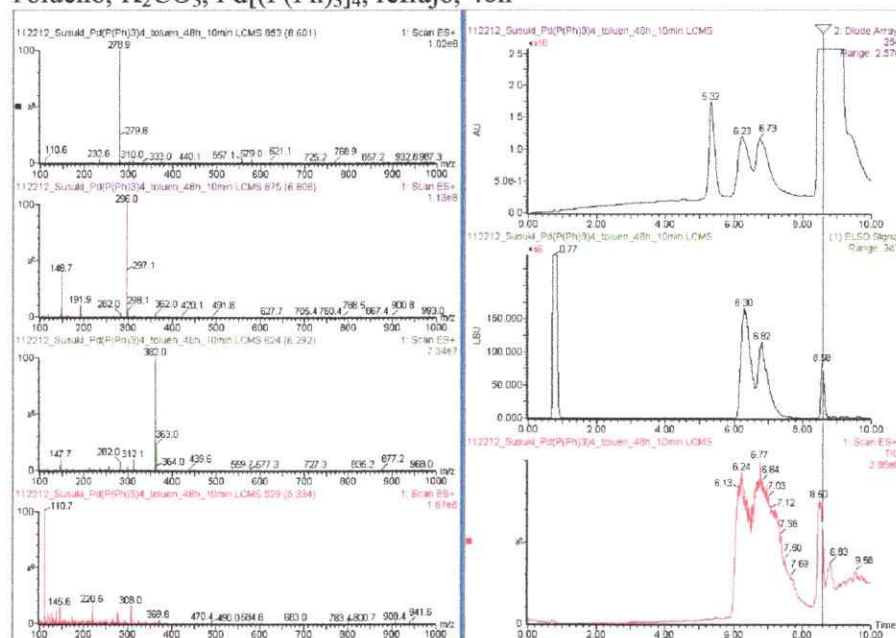
**Ib**

Tolueno,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}[(\text{P}(\text{Ph})_3)_4]$ , reflujo, 24h

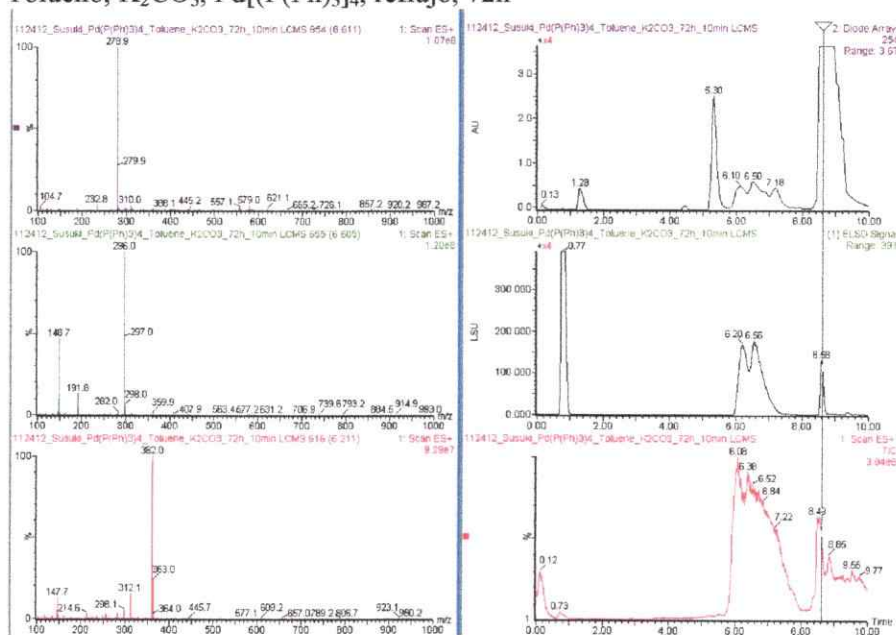


**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa*

**Ic** Tolueno,  $K_2CO_3$ ,  $Pd[(P(Ph)_3)_4]$ , reflujo, 48h

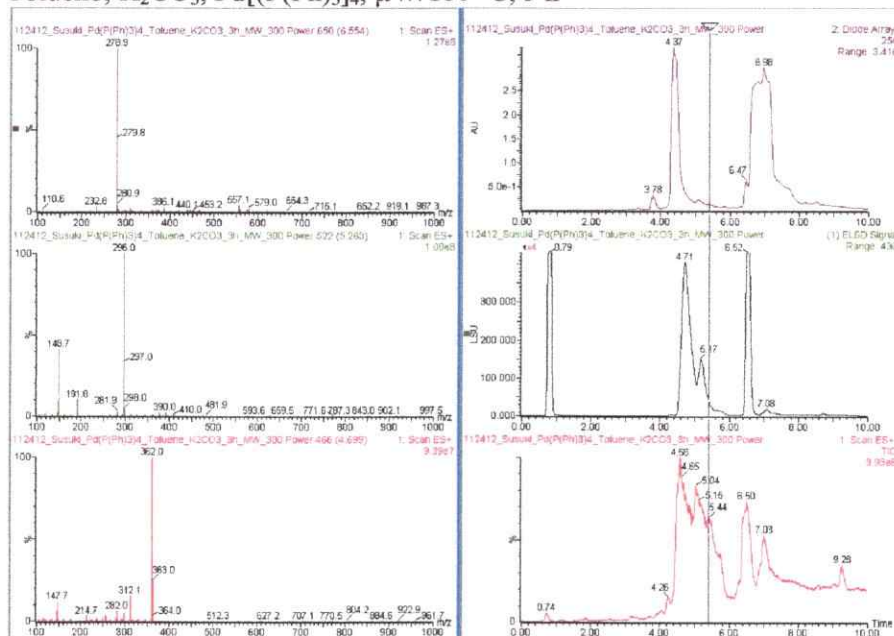


**Id** Tolueno,  $K_2CO_3$ ,  $Pd[(P(Ph)_3)_4]$ , reflujo, 72h

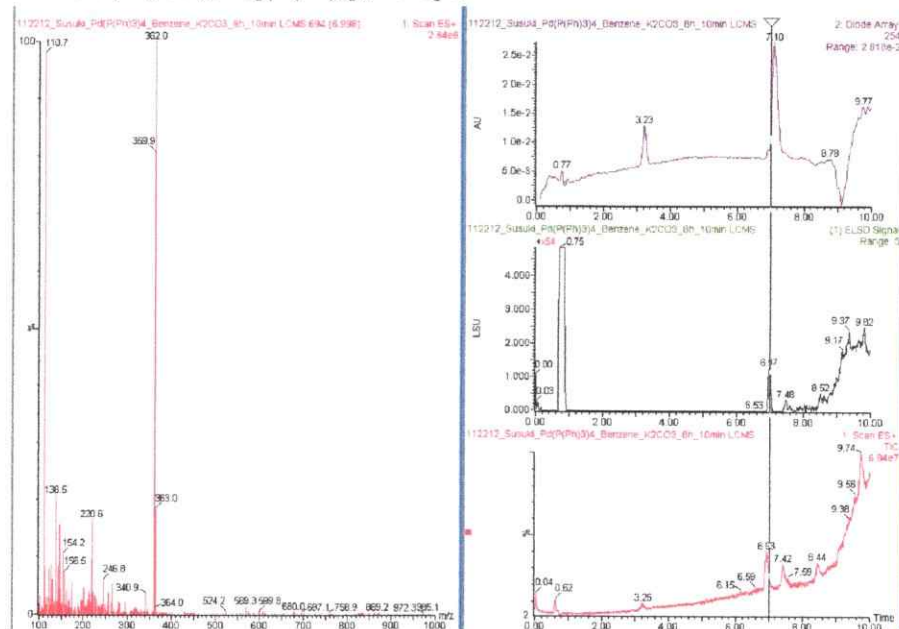


**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa*

**II** Tolueno,  $K_2CO_3$ ,  $Pd[(P(Ph)_3)_4]$ ,  $\mu W/180^\circ C$ , 3 h



**III** Benceno,  $K_2CO_3$ ,  $Pd[(P(Ph)_3)_4]$ , reflujo, 8 h

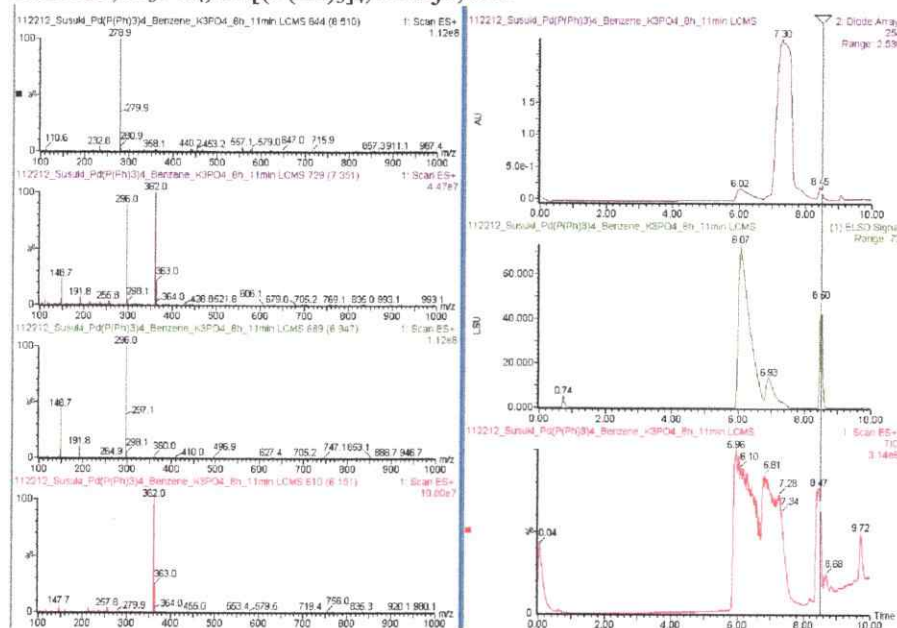


# ANEXO B

## Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa

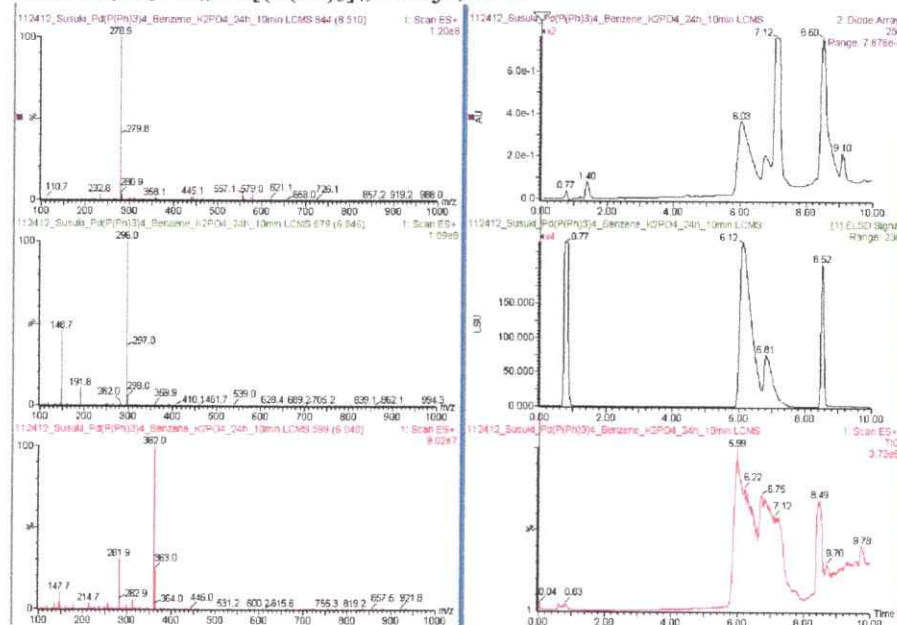
IVa

Benceno,  $K_3PO_4$ ,  $Pd[(P(Ph)_3)_4]$ , reflujo, 8 h



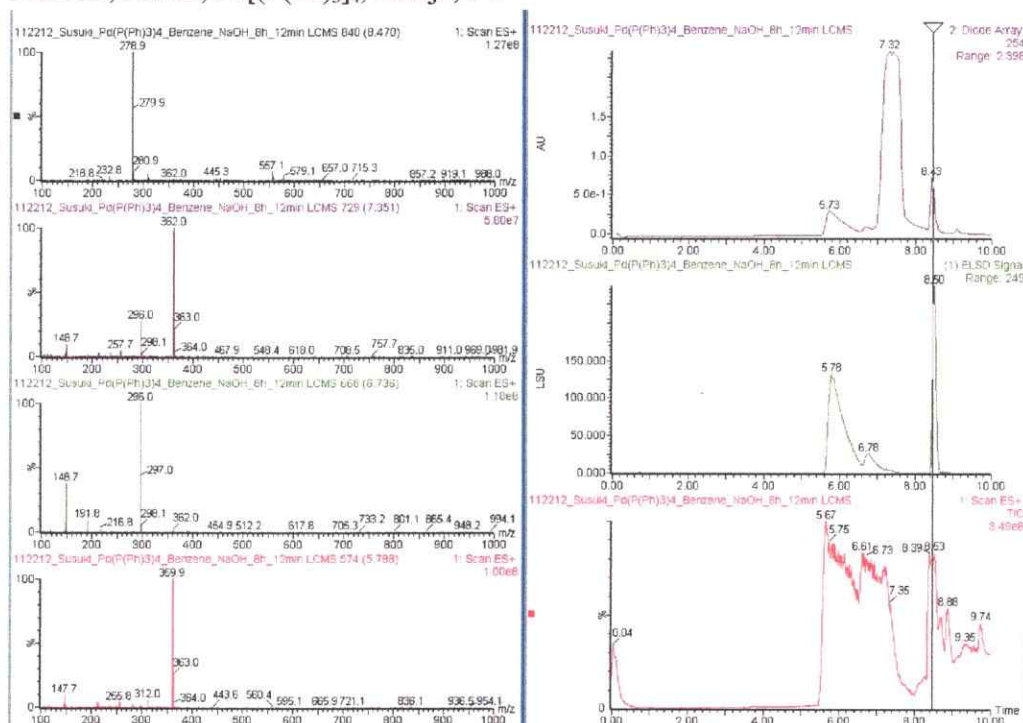
IVb

Benceno,  $K_3PO_4$ ,  $Pd[(P(Ph)_3)_4]$ , reflujo, 24 h

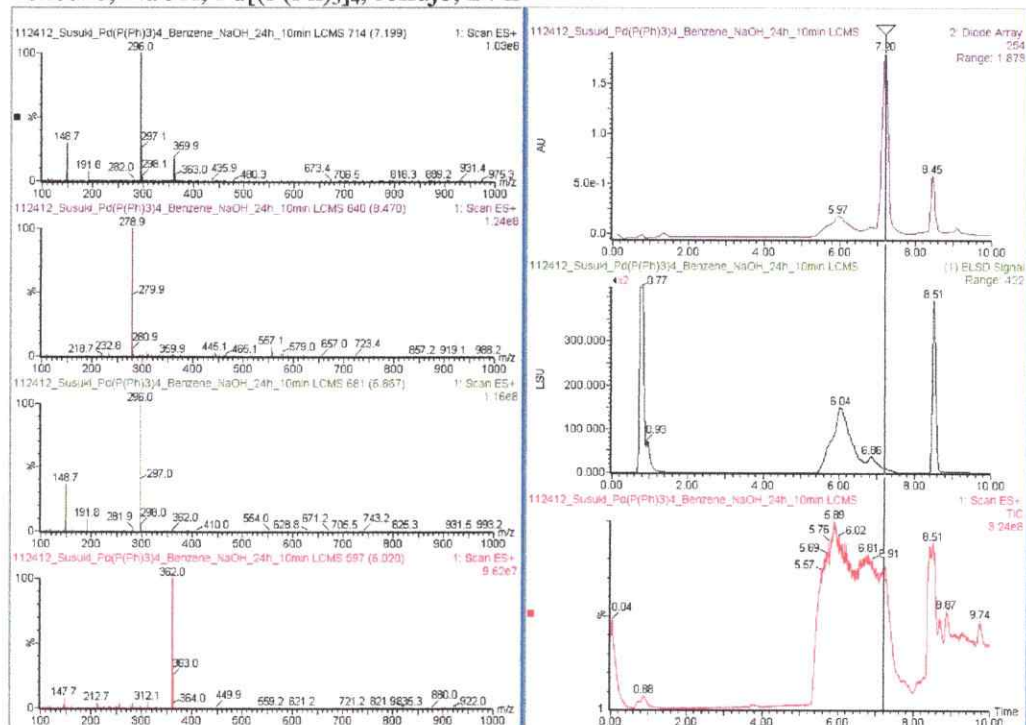


**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica Espectrometría de masa*

**Va** Benceno, NaOH, Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], reflujo, 8 h

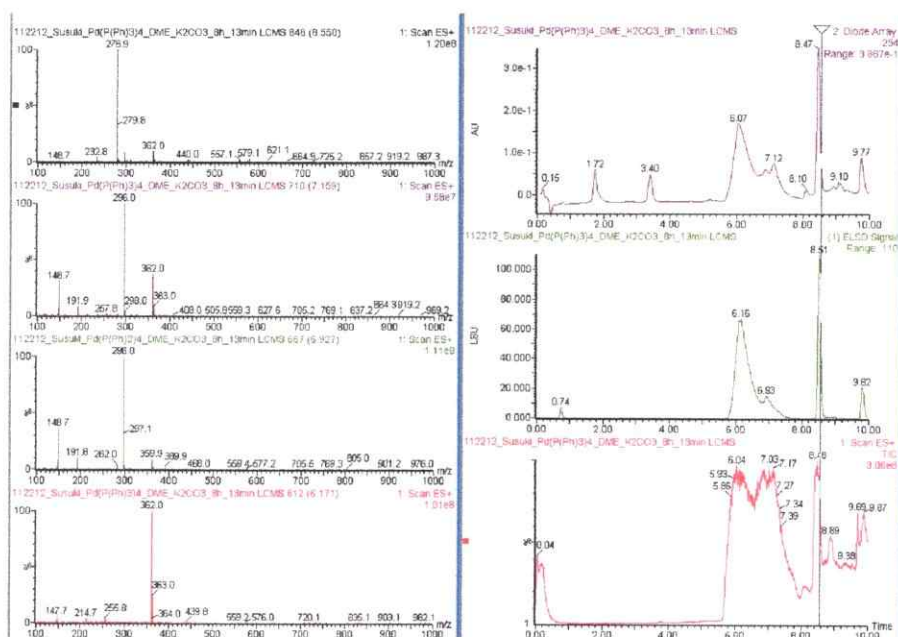


**Vb** Benceno, NaOH, Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], reflujo, 24 h

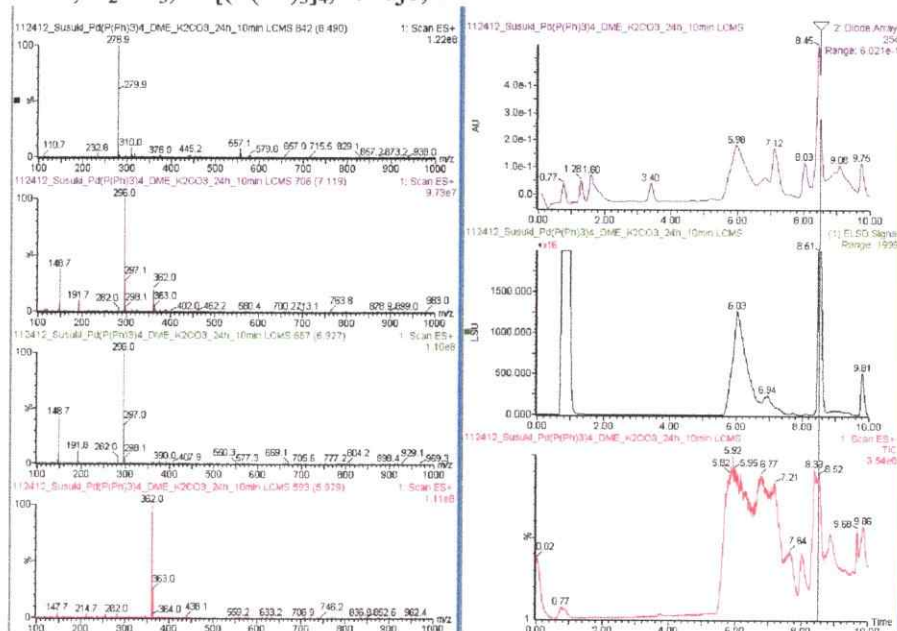


**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica Espectrometría de masa*

**Via** DME, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], reflujo, 8 h



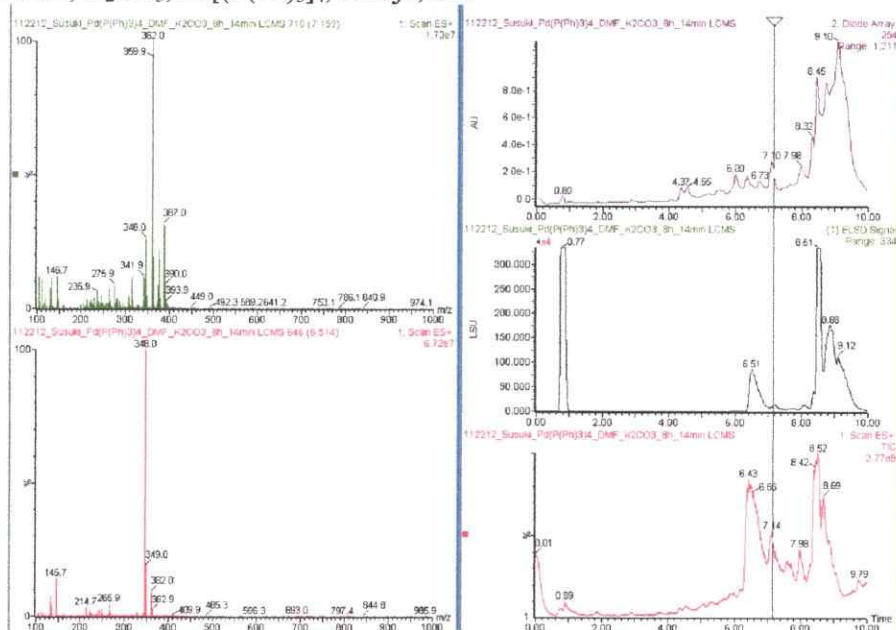
**Vib** DME, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], reflujo, 24 h



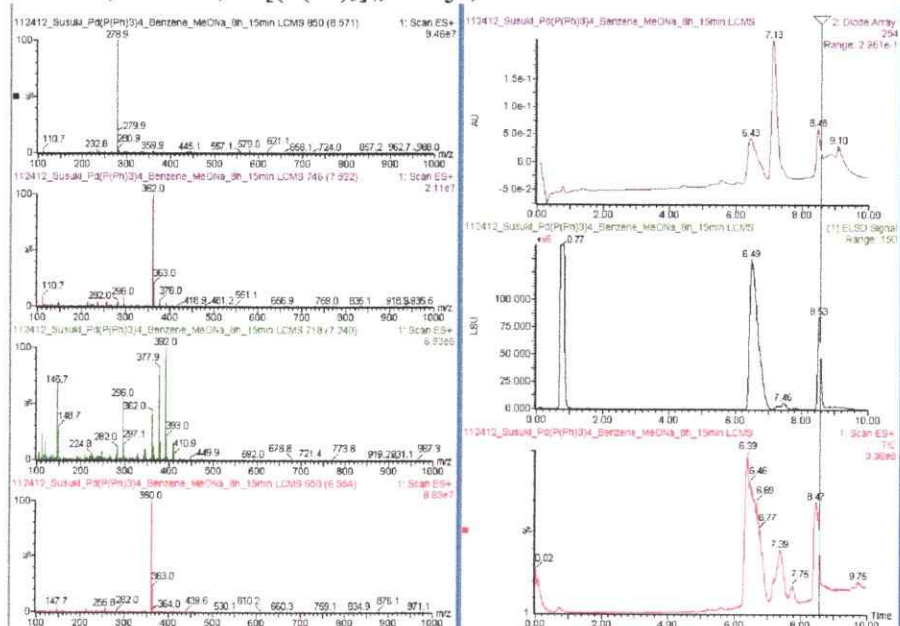
## ANEXO B

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa

#### VII DMF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], reflujo, 8 h



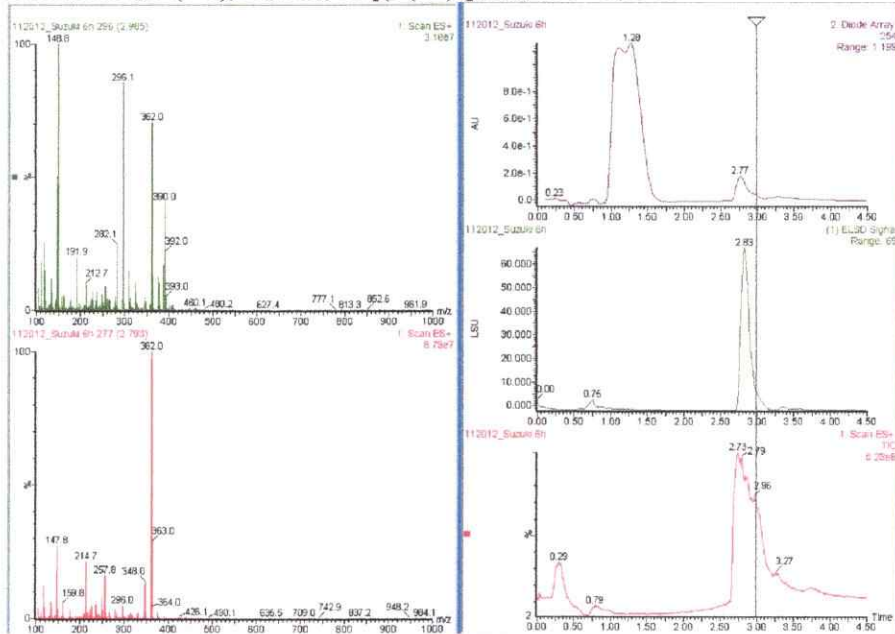
#### VIII Benceno, NaOMe, Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], reflujo, 8 h



**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa*

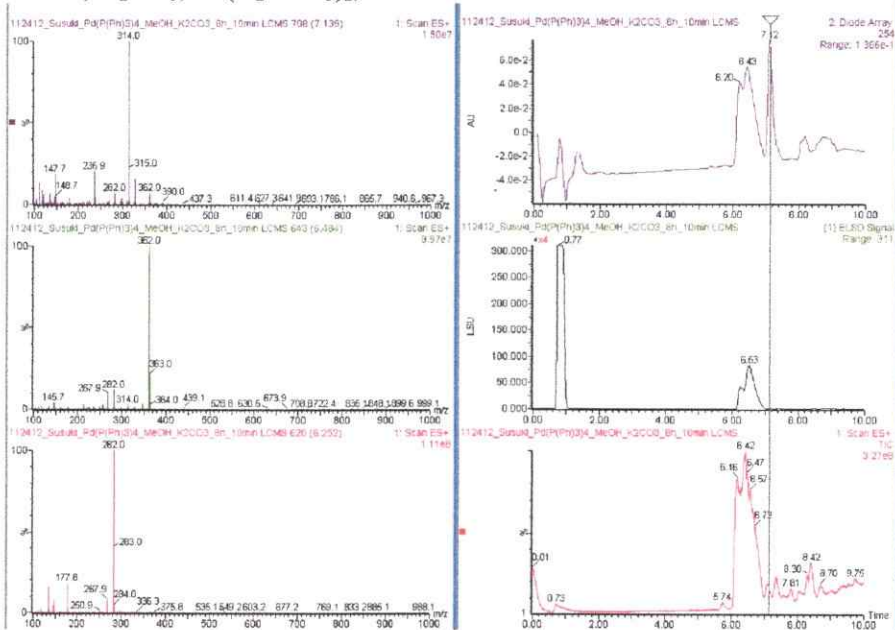
**IX**

Dioxano:H<sub>2</sub>O (5:1), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd[(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], 100 °C, 6 h



**X**

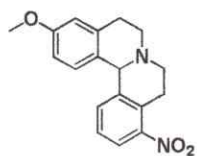
MeOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 60 °C



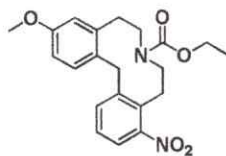


## ANEXO B

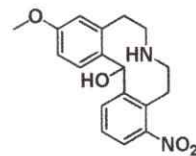
### Síntesis Orgánica \_ Espectrometría de masa



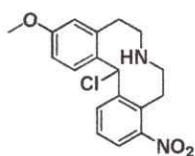
310,13 g/mol **12**



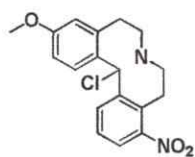
384,17 g/mol **14**



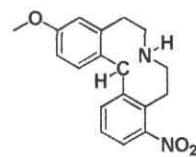
328,14 g/mol **31a**



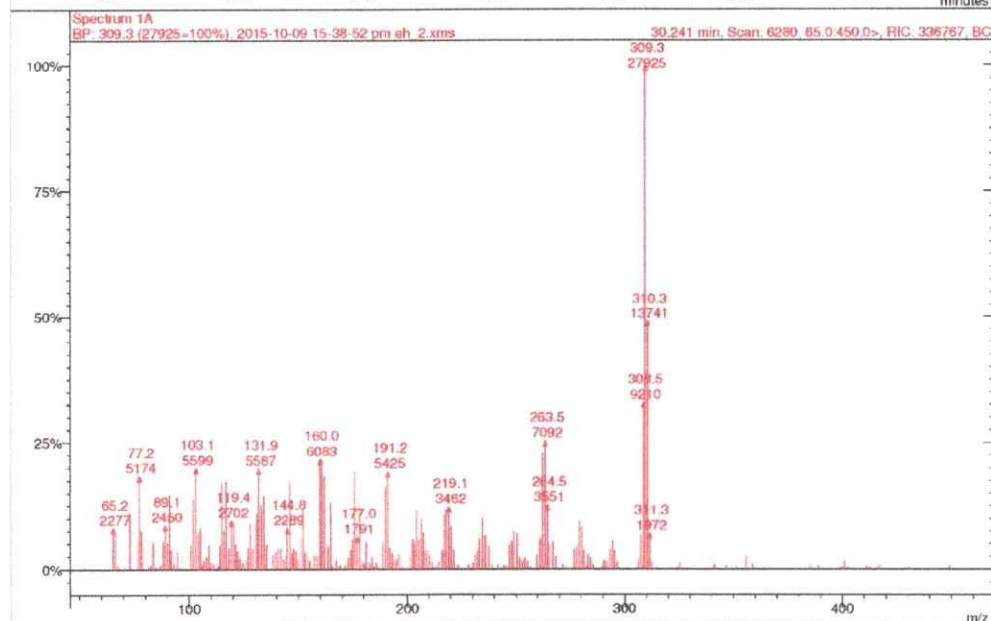
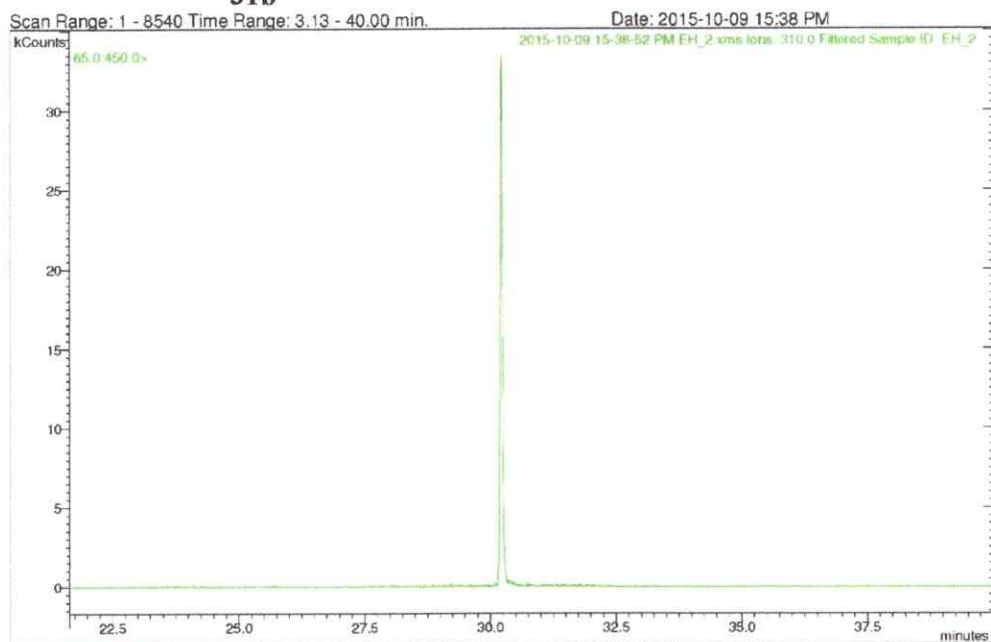
346,11 g/mol **31b**



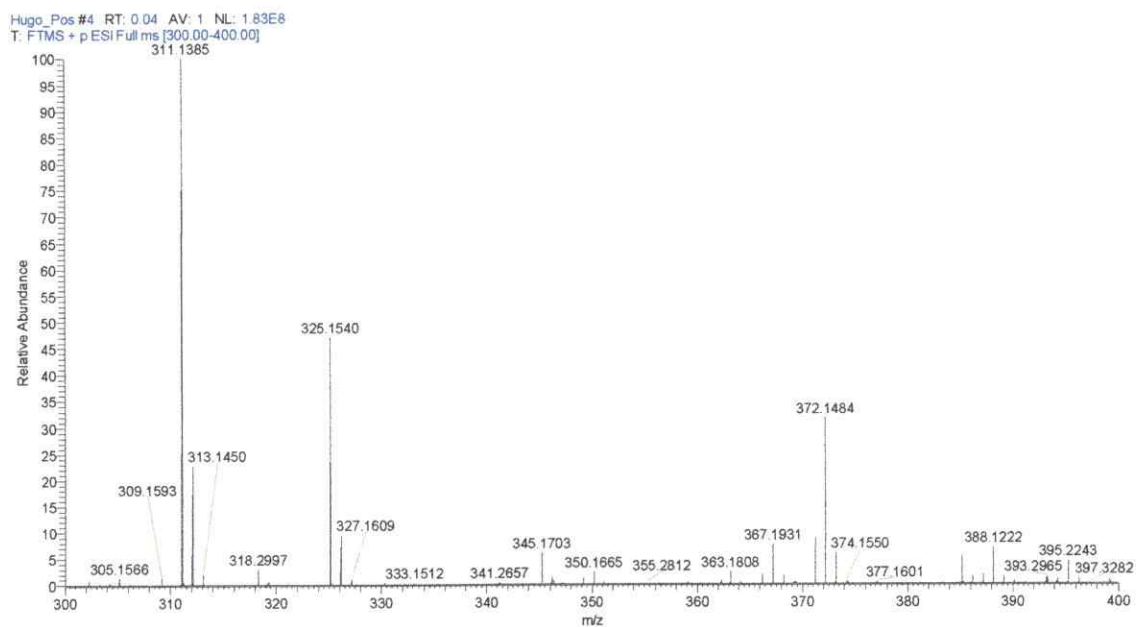
345,10 g/mol **(31b')**



311,14 g/mol **(31b'')**



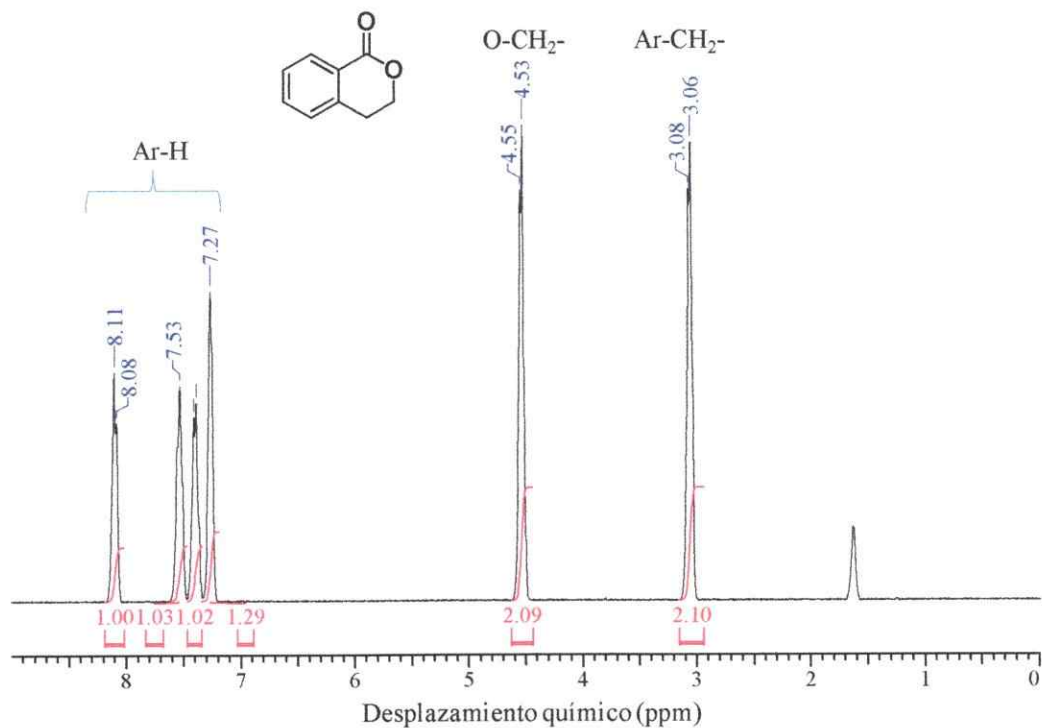
**ANEXO B**  
*Síntesis Orgánica\_Espectrometría de masa*



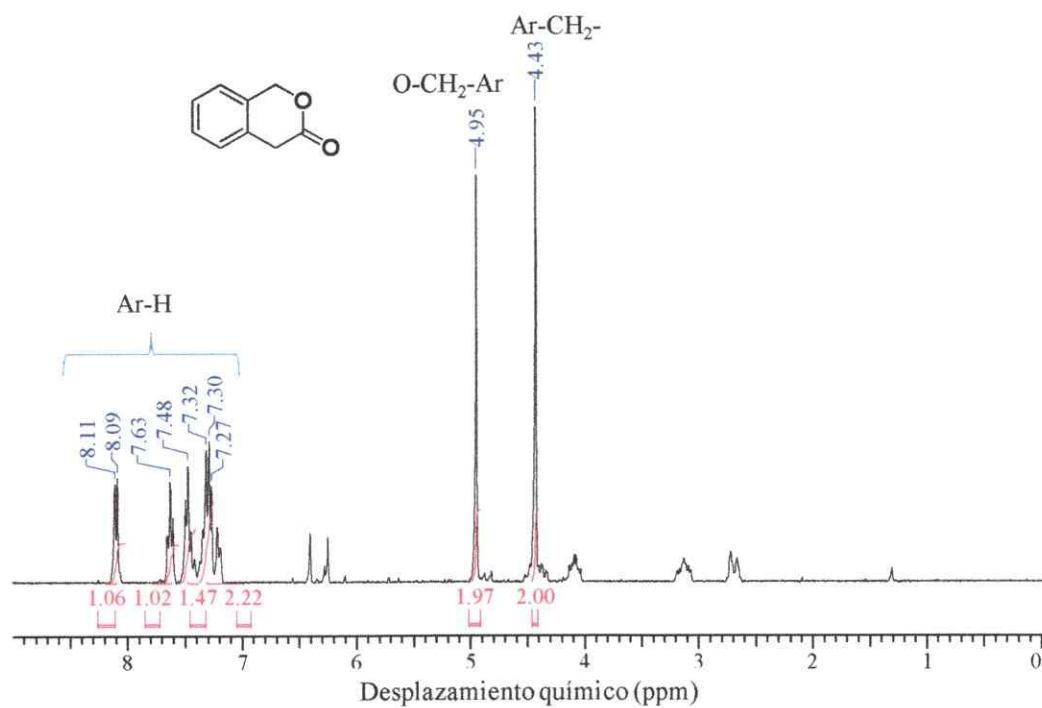
## ANEXO C

*Síntesis Orgánica \_Espectrometría de RMN e infraroja*

### Isocroman-1-ona (5)



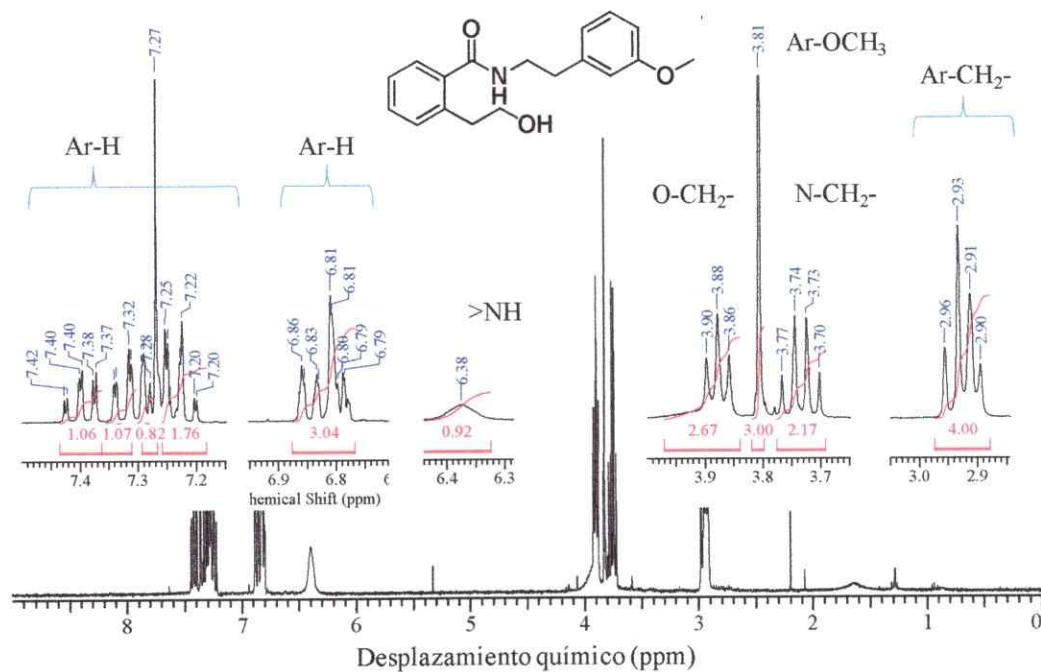
### Isocroman-3-ona, isómero estructural de 5



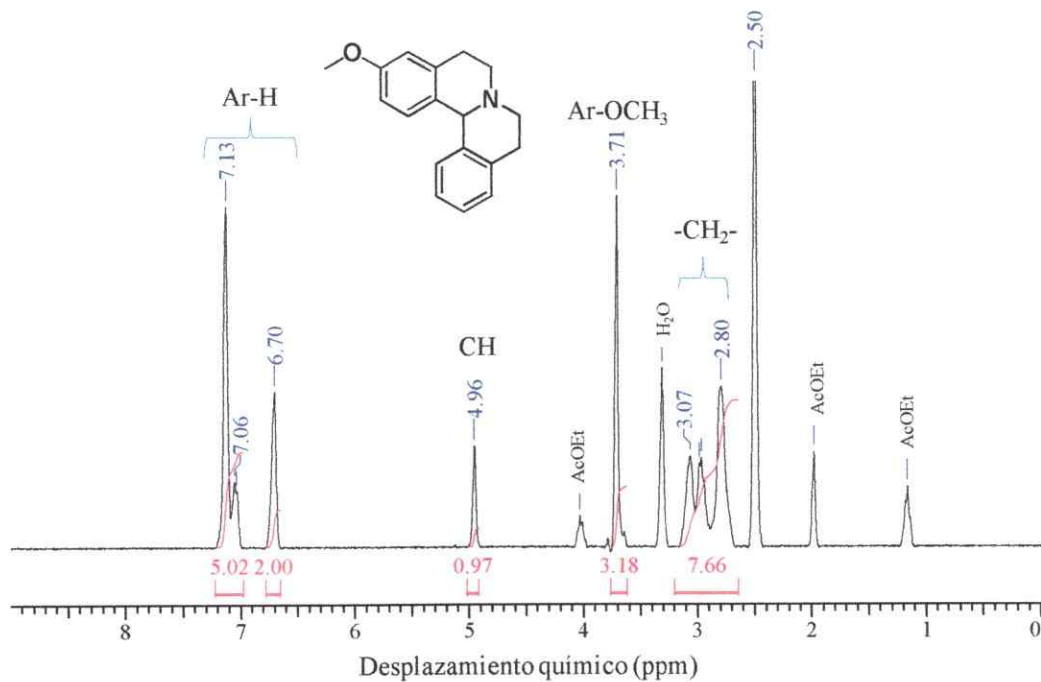
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica \_Espectrometría de RMN e infraroja

#### 2-(2-Hidroxiethyl)-N-(3-metoxifeniletil)benzamida (7)



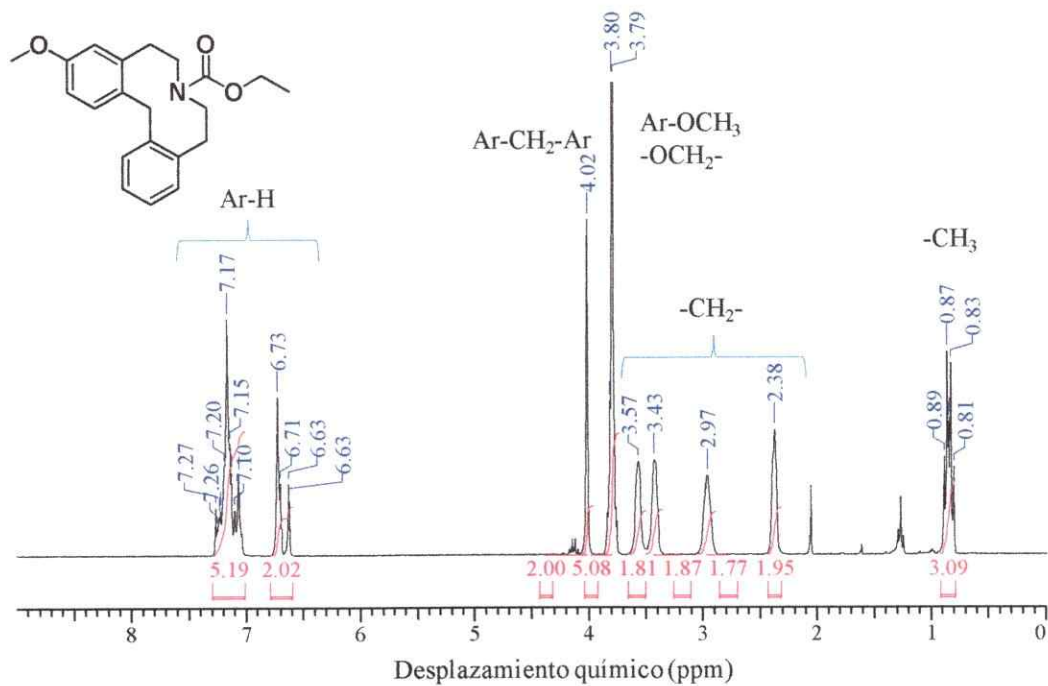
#### 3-Metoxi-6,8,9,13 b-tetrahidro-5H-isoquinolino[1,2-a]isoquinolina (8)



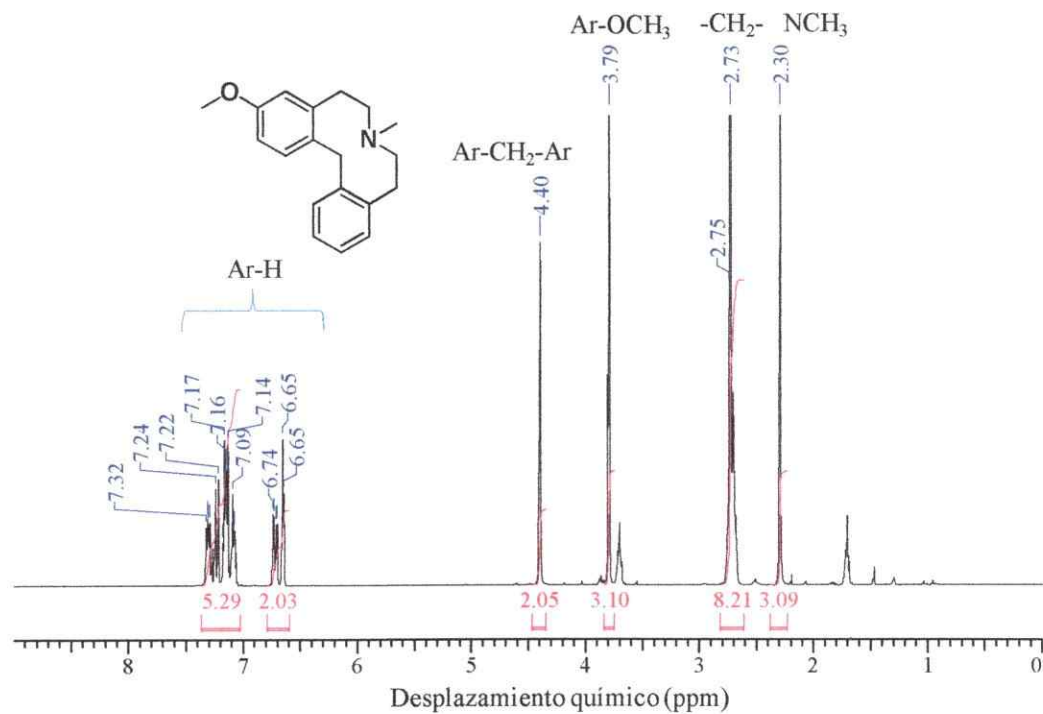
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica *Espectrometría de RMN e infraroja*

#### 3-metoxi-5,6,8,9-tetrahidrodibenz[*d,g*]acecina-7(14H)-carboxilato de etilo (9).



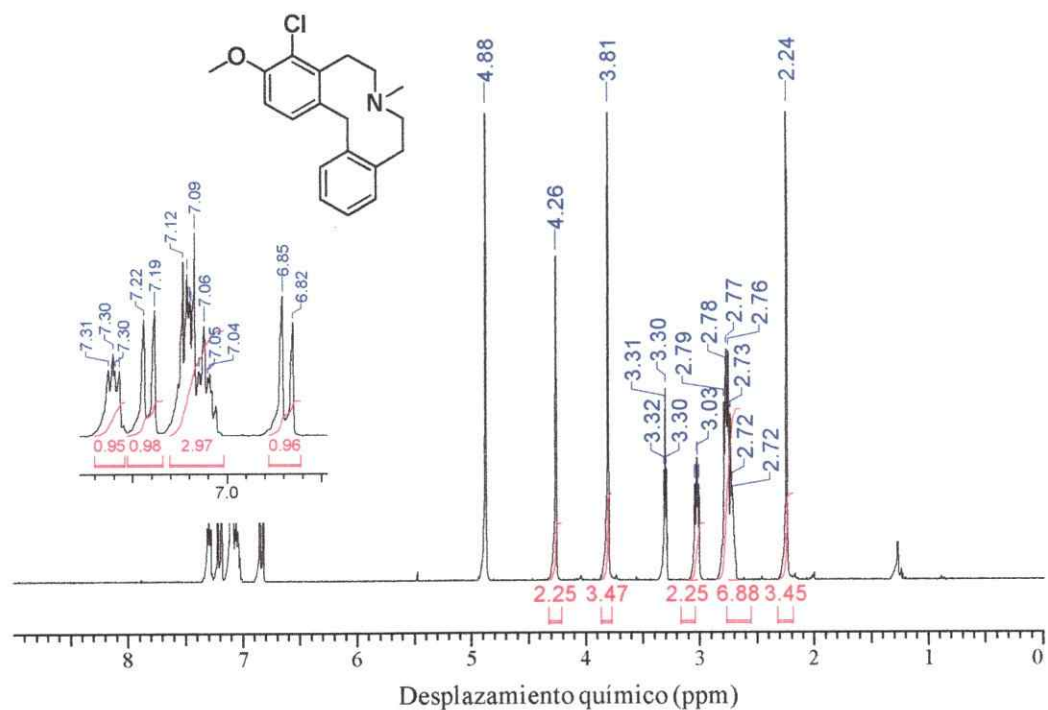
#### 3-Metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (3a)



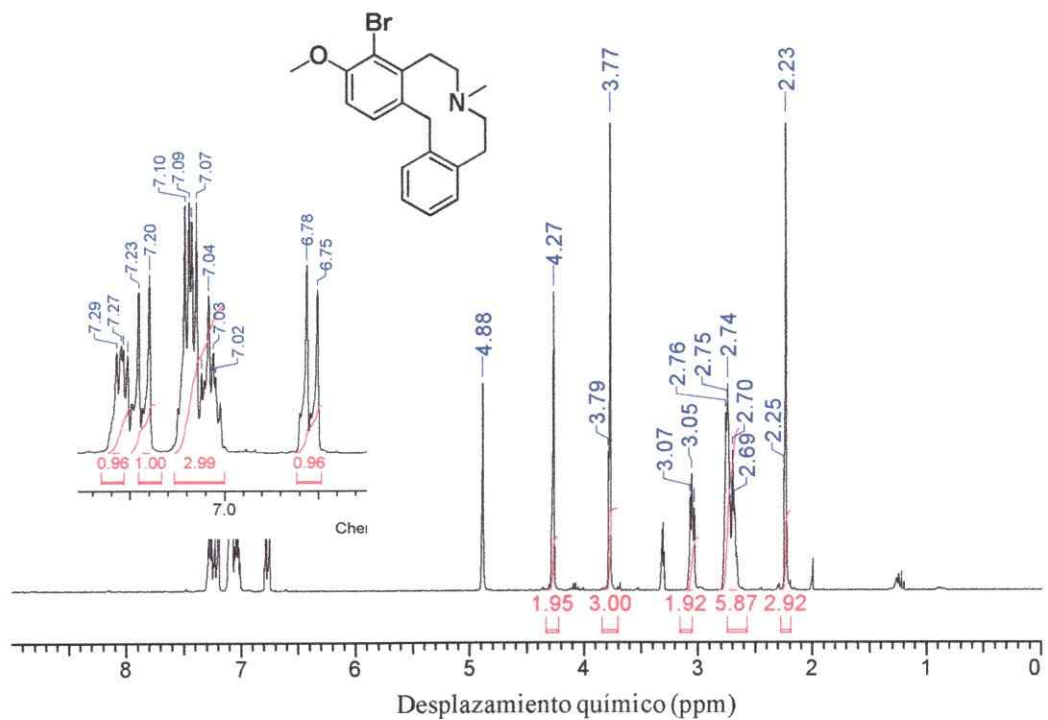
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de RMN e infraroja

#### 4-Cloro-3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (3b)



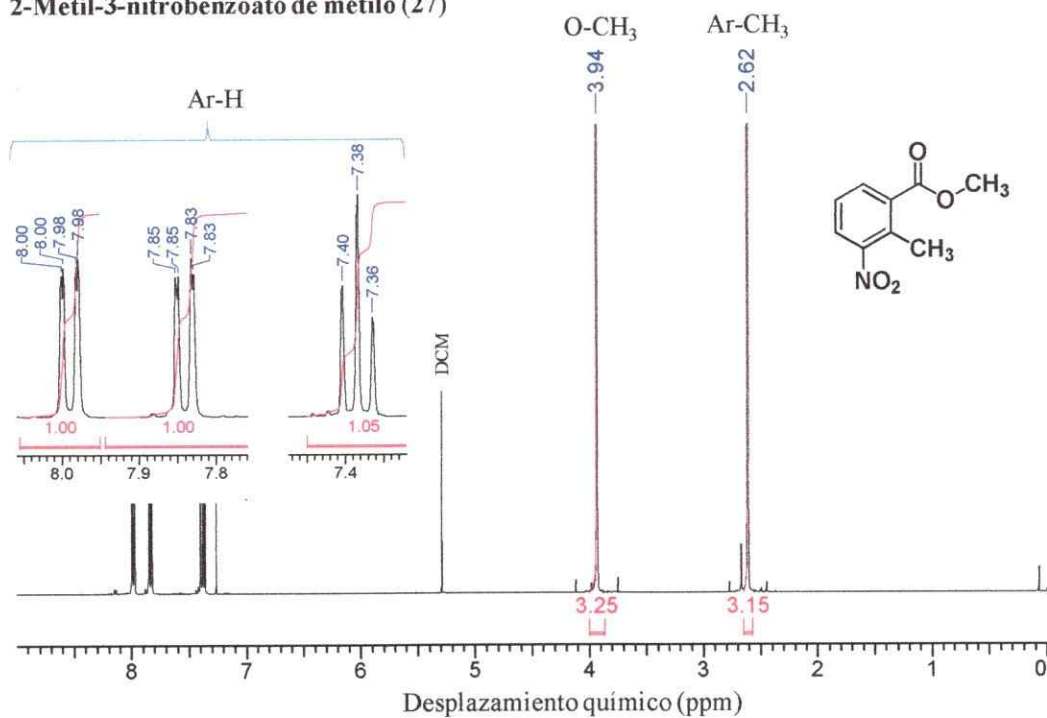
#### 4-Bromo-3-metoxi-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecine (3c)



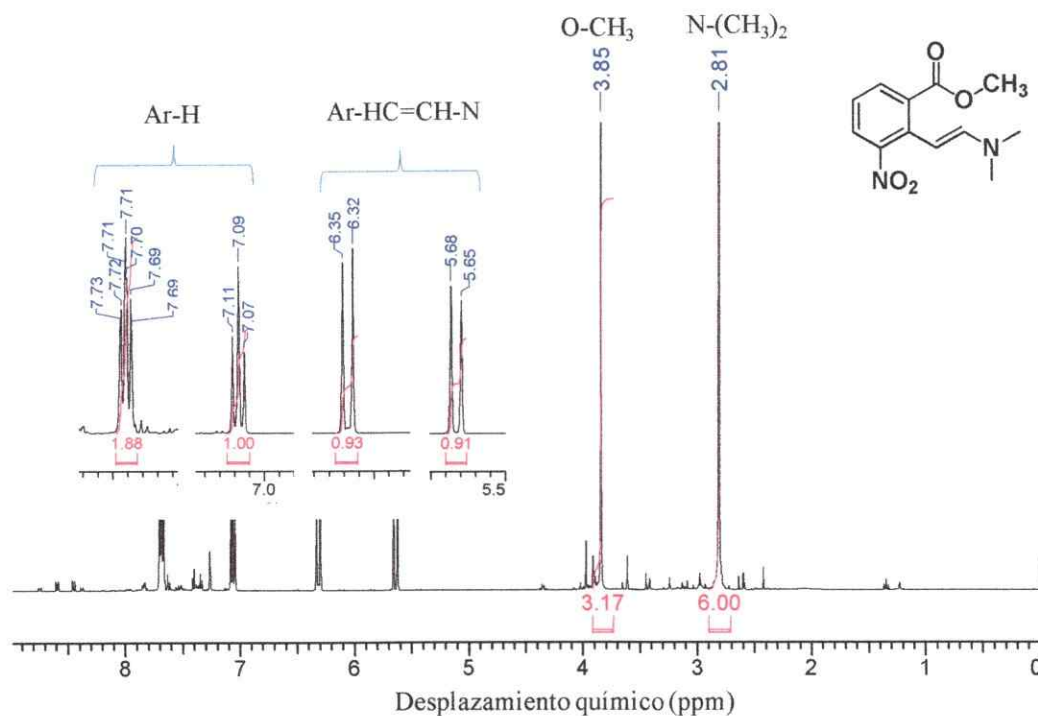
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de RMN e infraroja

#### 2-Metil-3-nitrobenzoato de metilo (27)



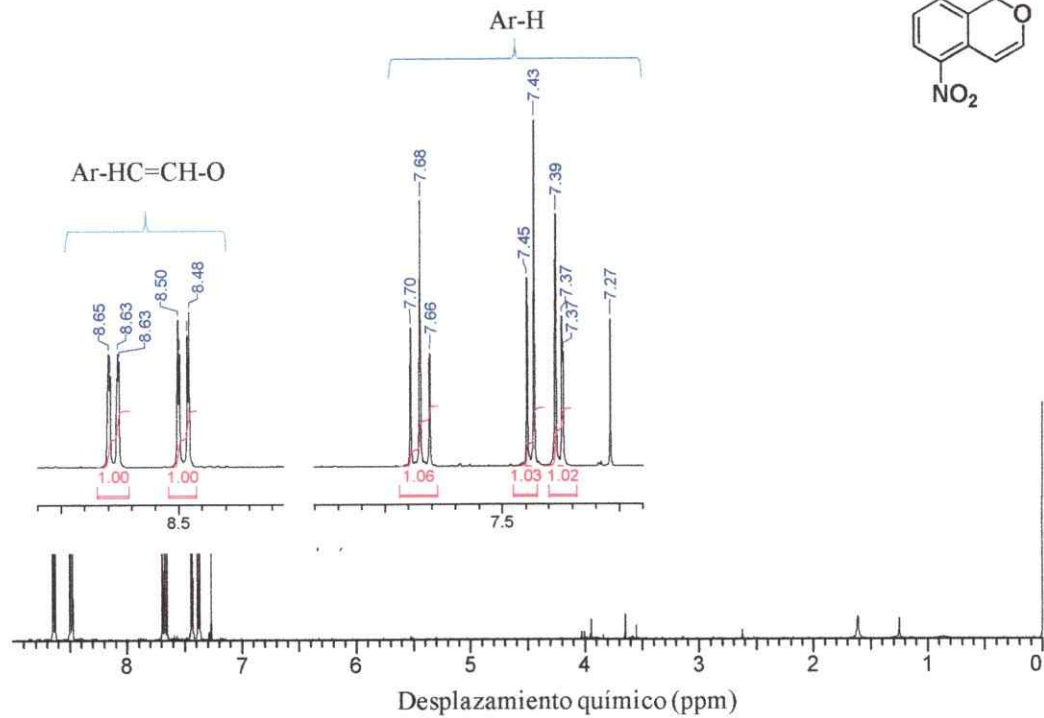
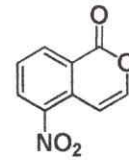
#### 2-(2-(Dimetilamino)vinil)-3-nitrobenzoato de metilo (28)



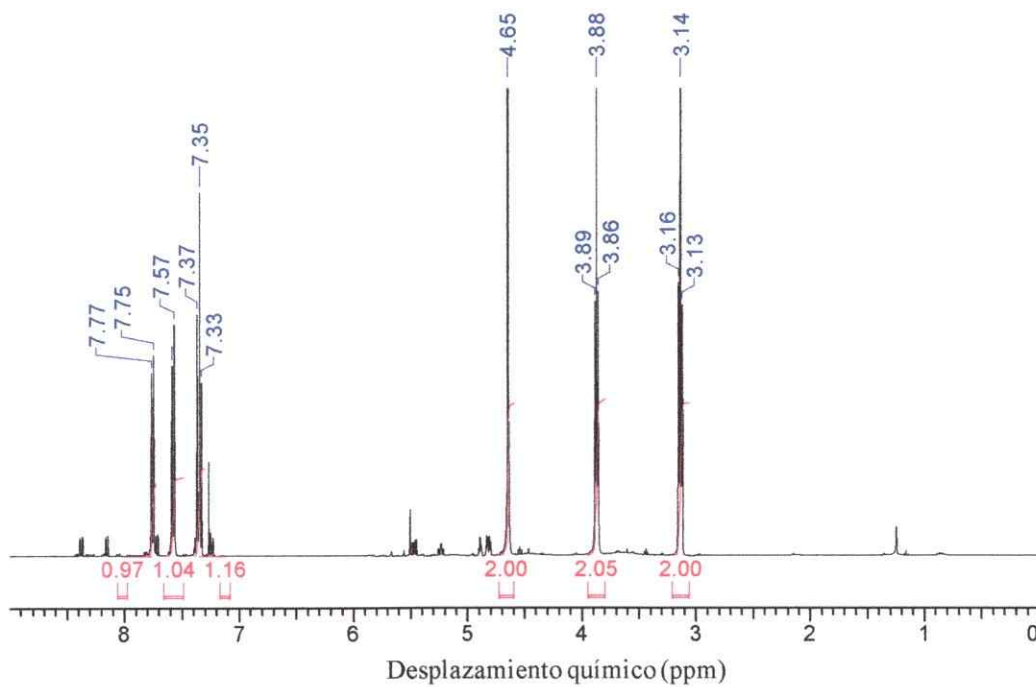
# ANEXO C

## Síntesis Orgánica\_Espectrometría de RMN e infraroja

### 5-Nitroisocroman-1-ona (29)



### Producto de reducción "A" obtenido desde 29\_ Espectro realizado en CDCl<sub>3</sub>

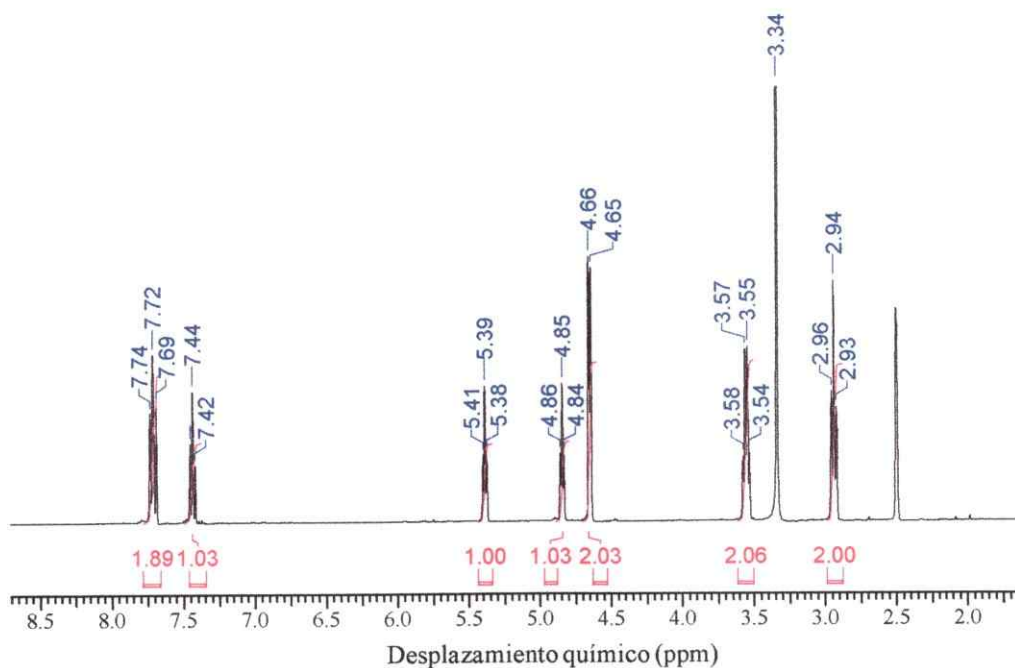




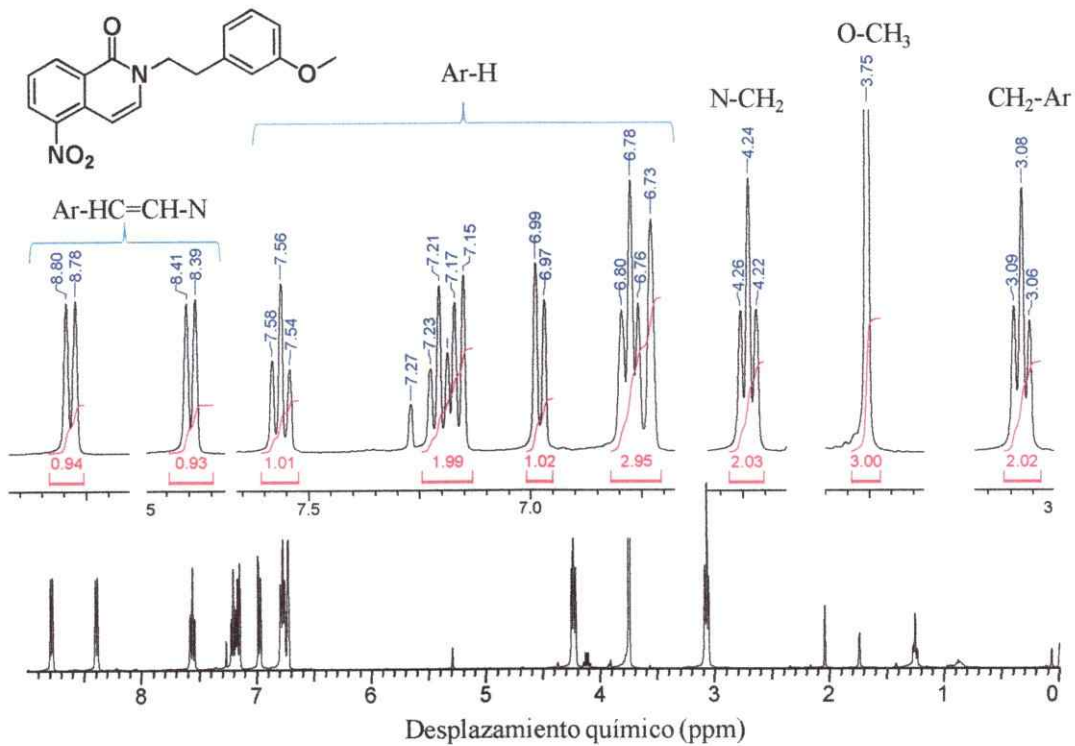
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de RMN e infraroja

Producto de reducción "B" obtenido desde 29\_ Espectro realizado en DMSO-d6



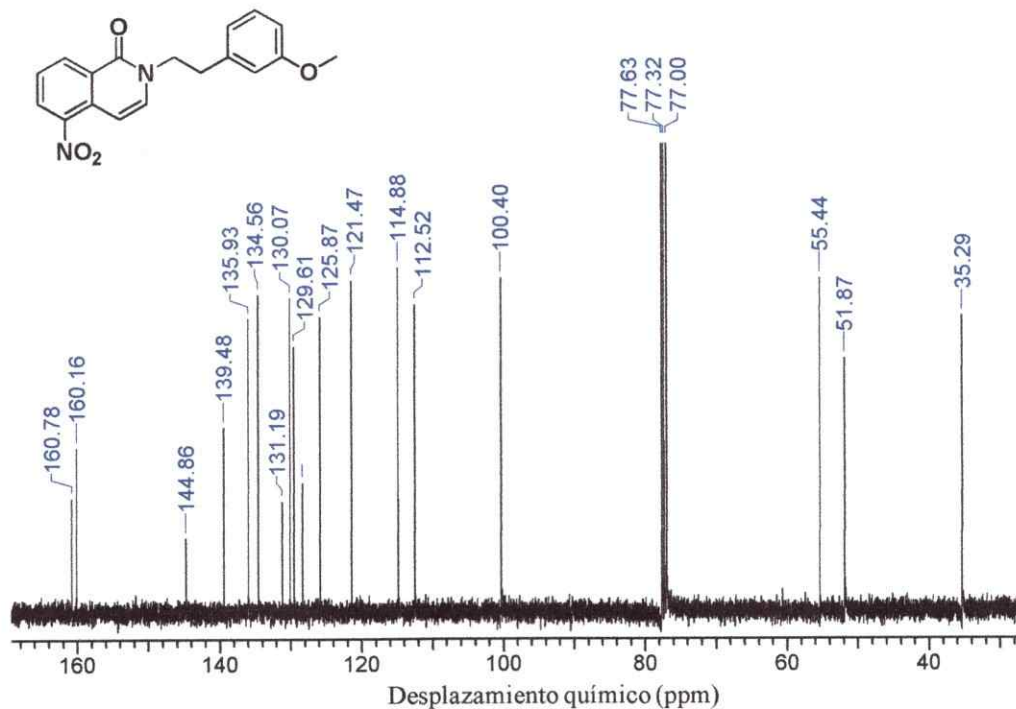
2-[2-(3-Metoxifenil)etil]-5-nitroisquinolin-1(2H)-ona (30)



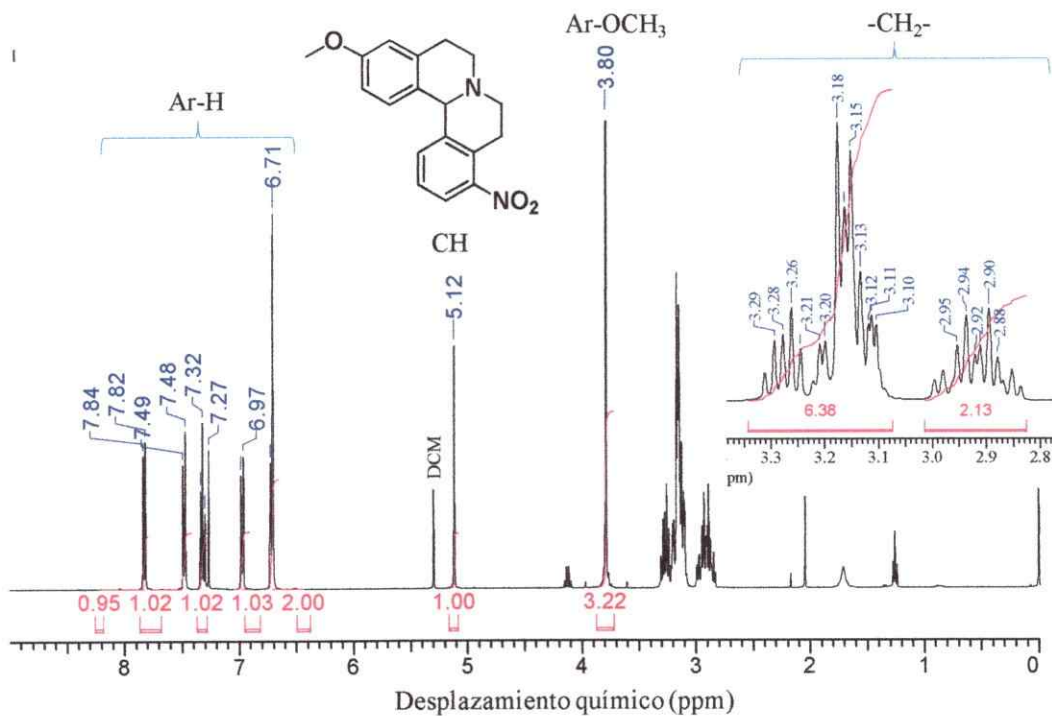
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de RMN e infraroja

**2-[2-(3-Metoxifenil)etil]-5-nitroisoquinolin-1(2H)-ona (30)**



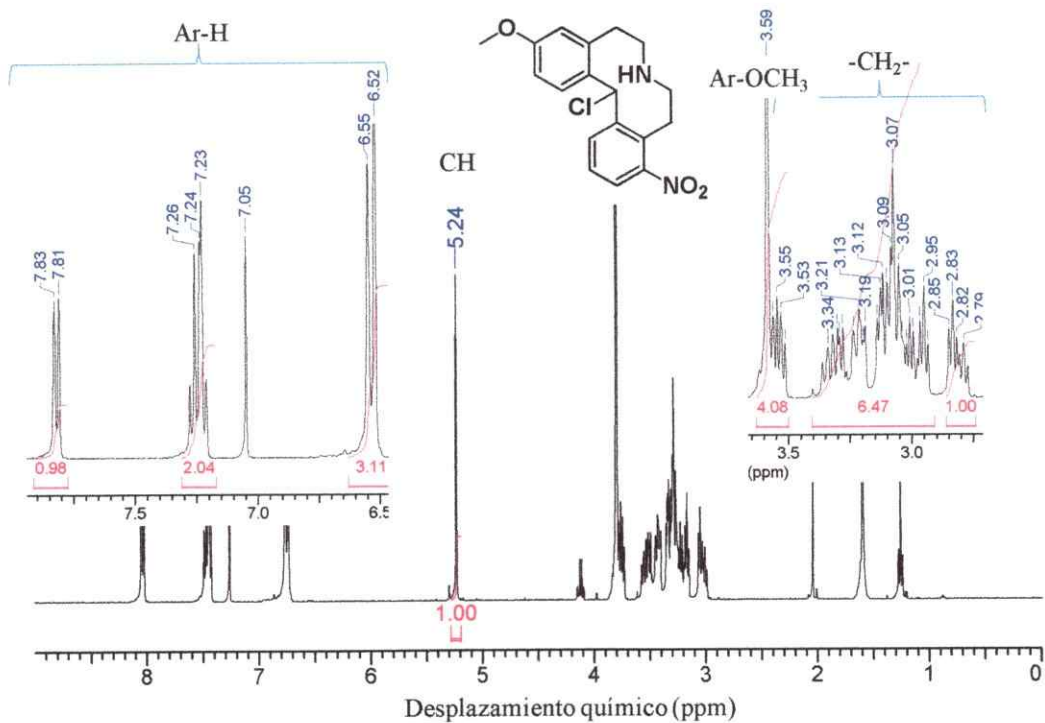
**3-Metoxi-10-nitro-6,8,9,13b-tetrahidro-5H-isoquinolino[1,2-a]isoquinolina (12)**



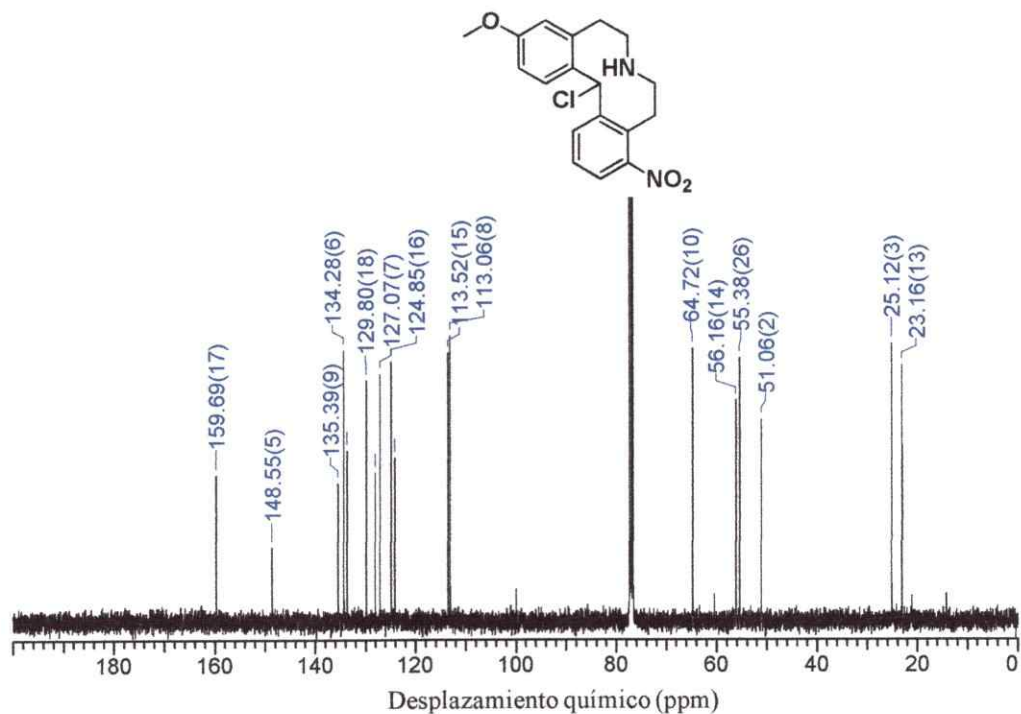
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de RMN e infrarojo

#### 14-Cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (31b)



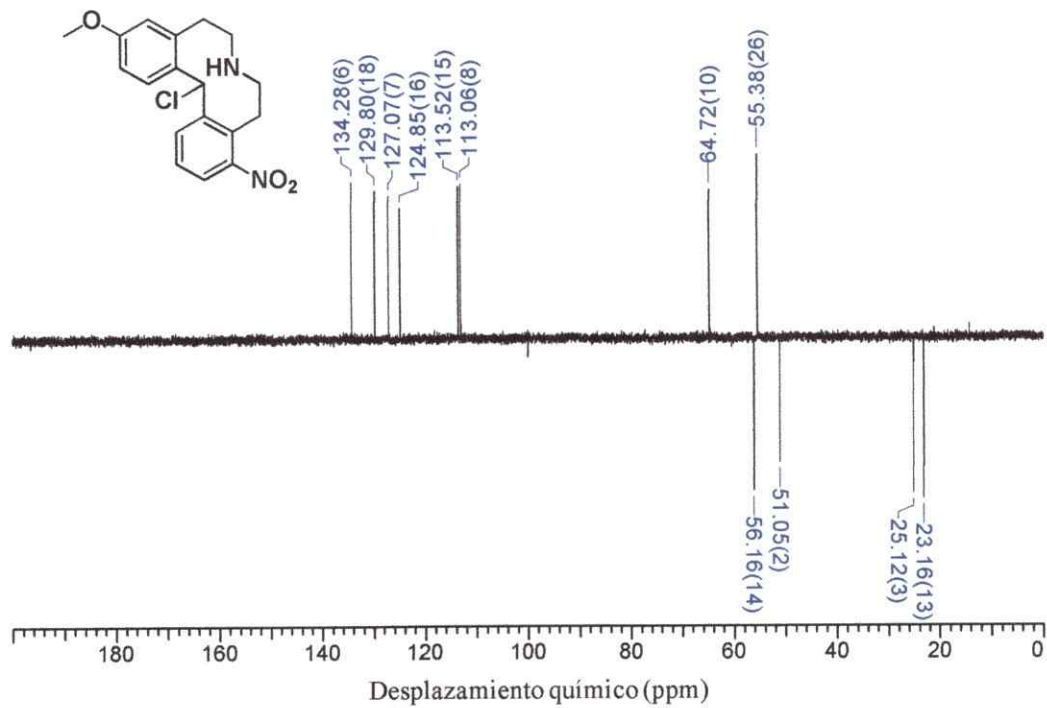
#### 14-Cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (31b)



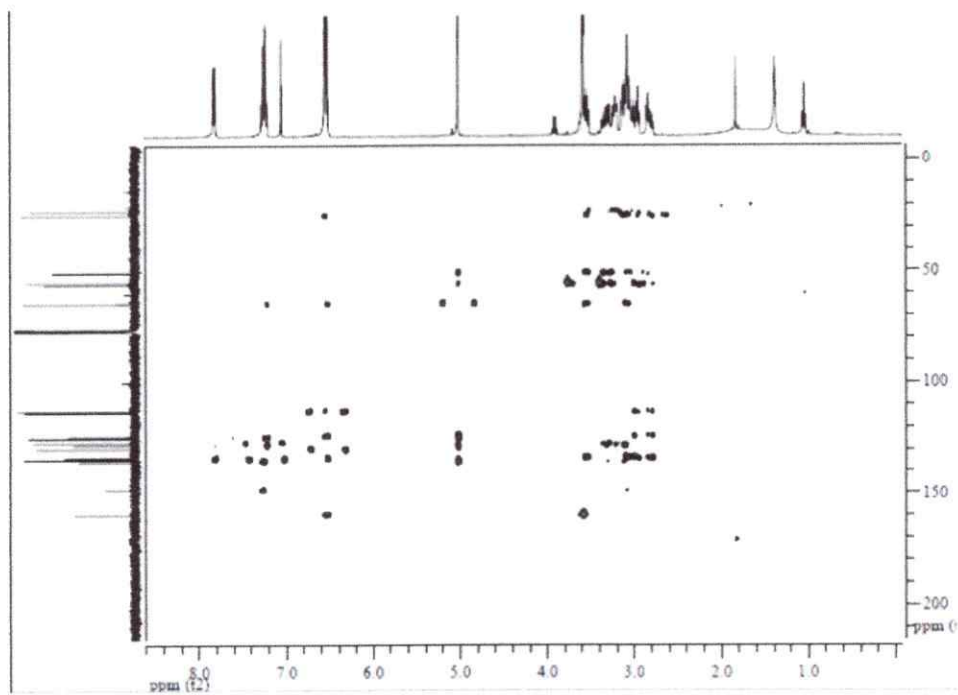
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de RMN e infraroja

#### 14-Cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (31b)\_DEPT135



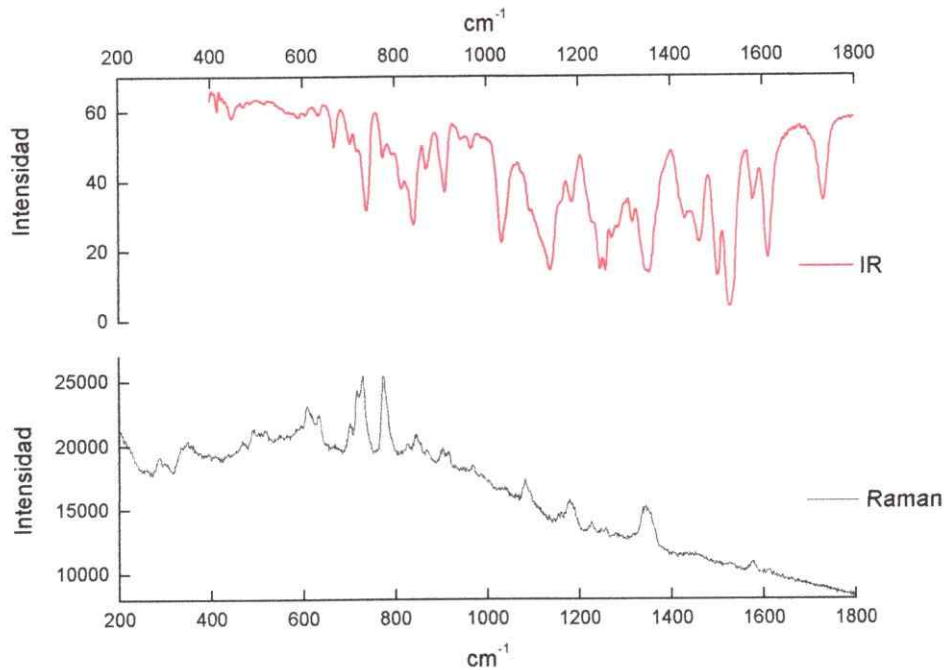
#### 14-Cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (31b)\_HMBC



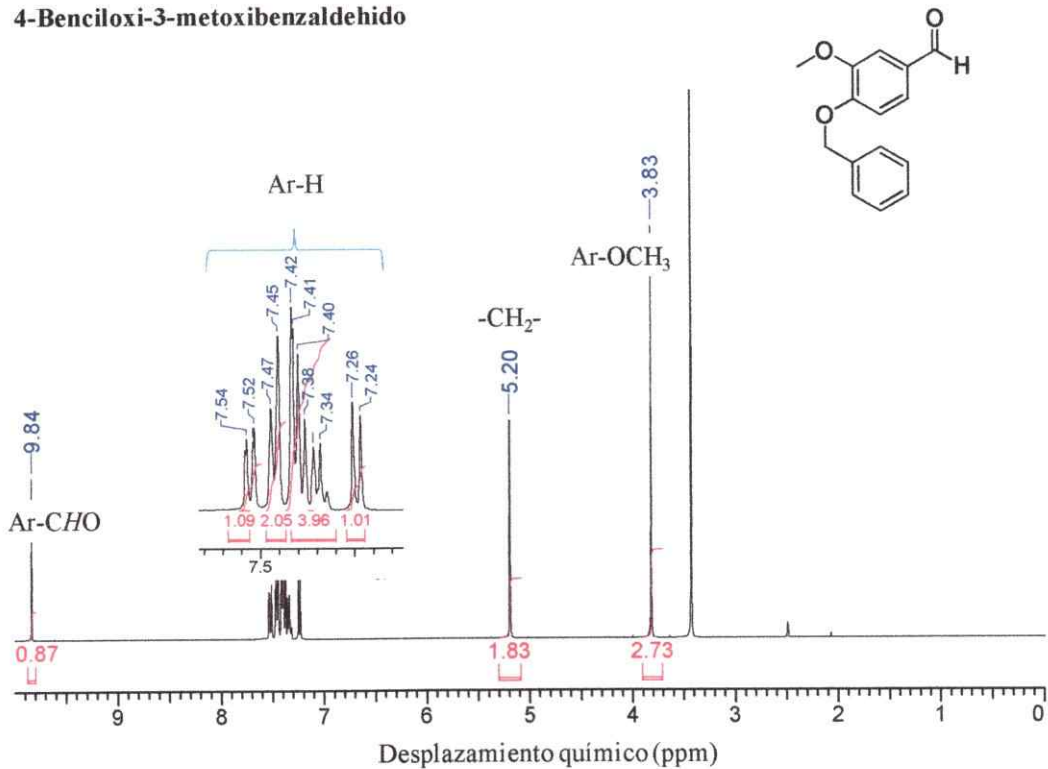
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica \_Espectrometría de RMN e infraroja

#### 14-Cloro-3-metoxi-10-nitro-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]acecina (31b)



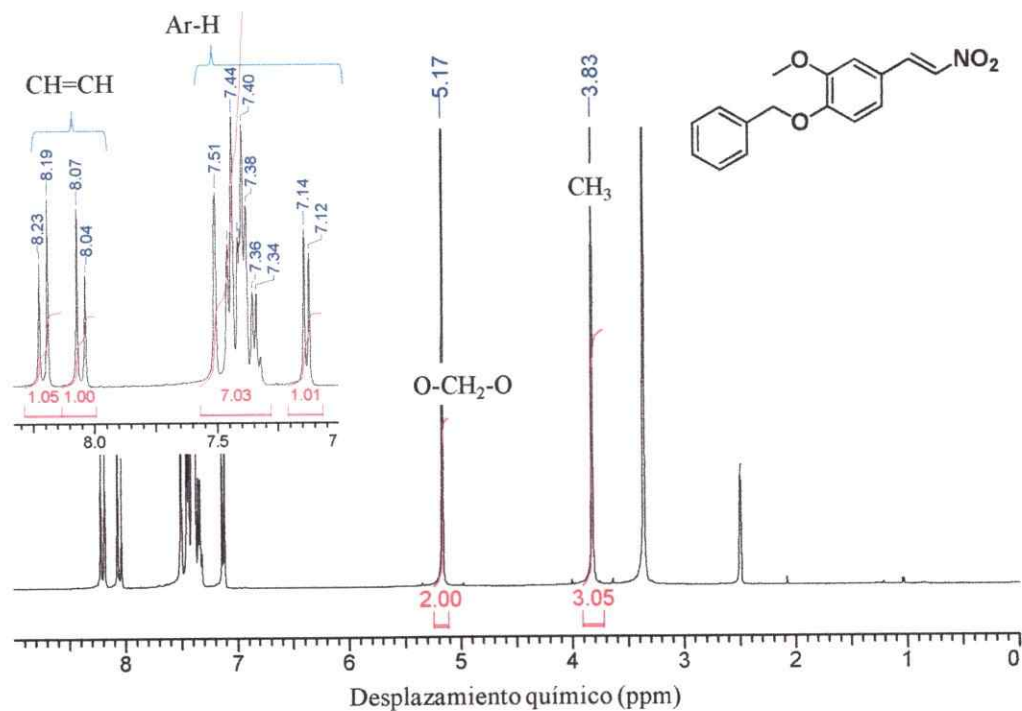
#### 4-Benciloxi-3-metoxibenzaldehído



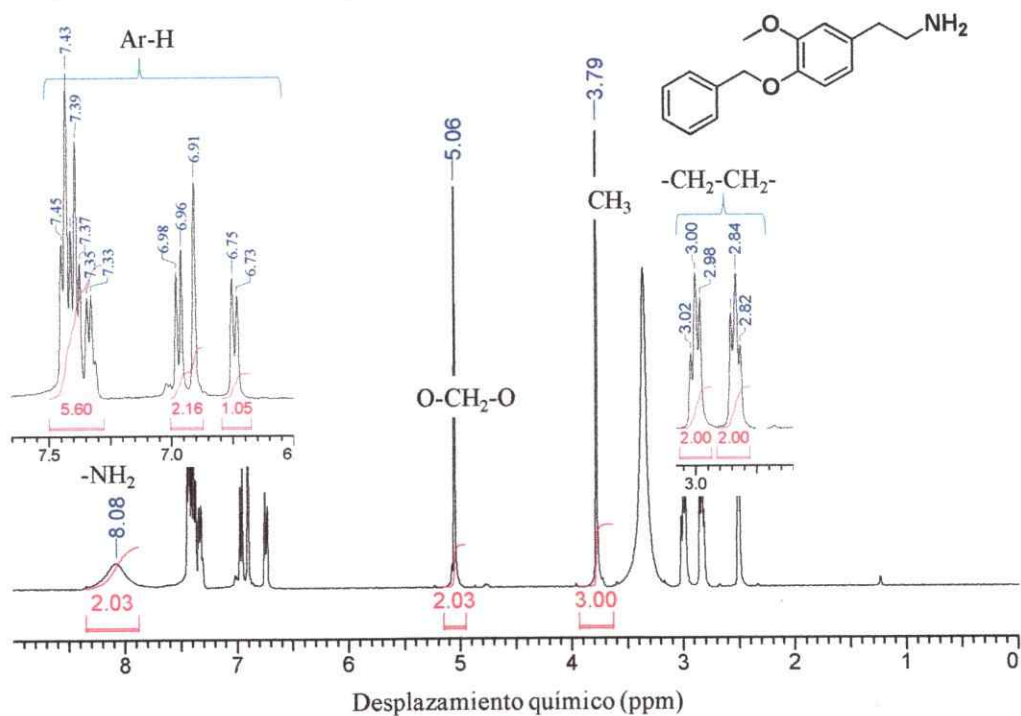
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica \_Espectrometría de RMN e infraroja

#### 1-Benciloxi-2-metoxi-4-(2-nitrovinil)benceno (38)



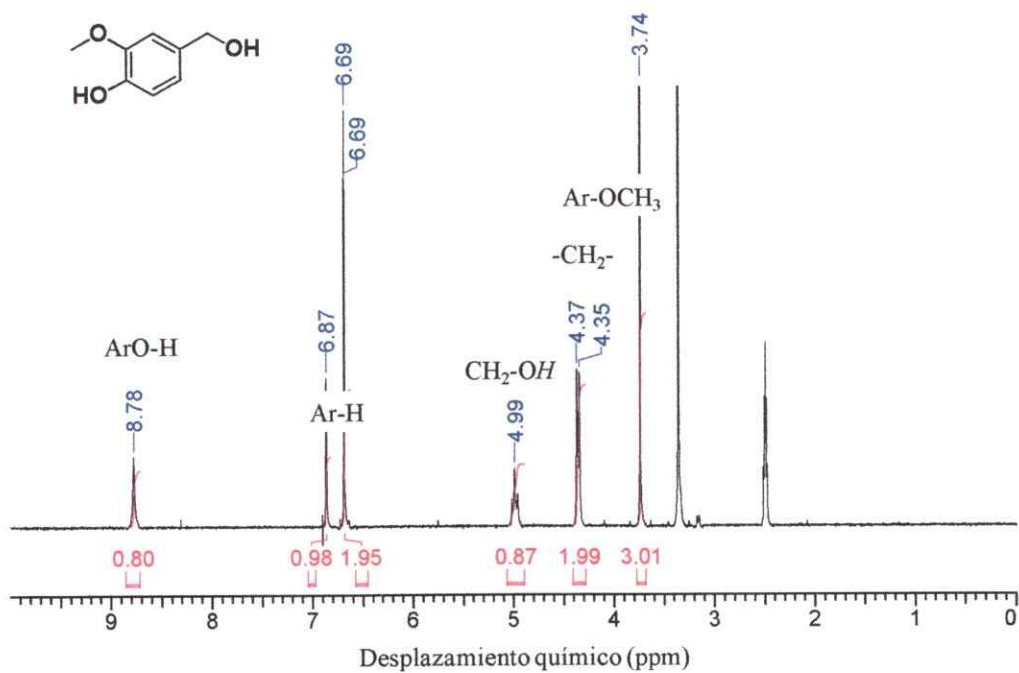
#### 2-(4-Benciloxi-3-metoxifenil)etilamina (35b)



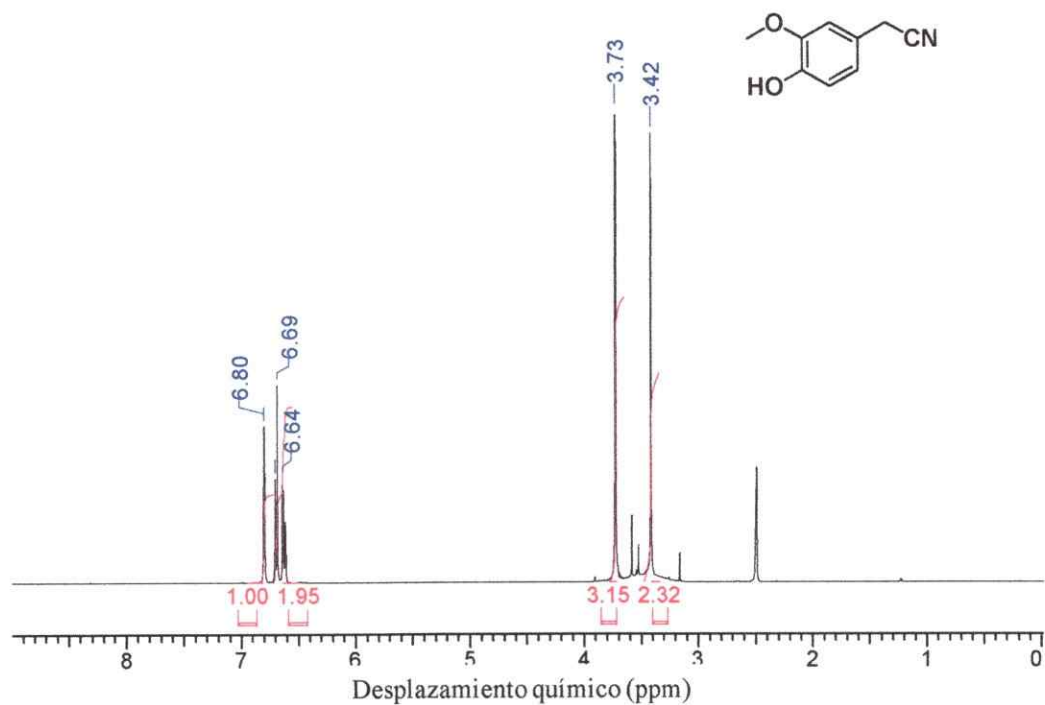
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica \_ Espectrometría de RMN e infraroja

#### 4-(Hidroximetil)-2-metoxifenol



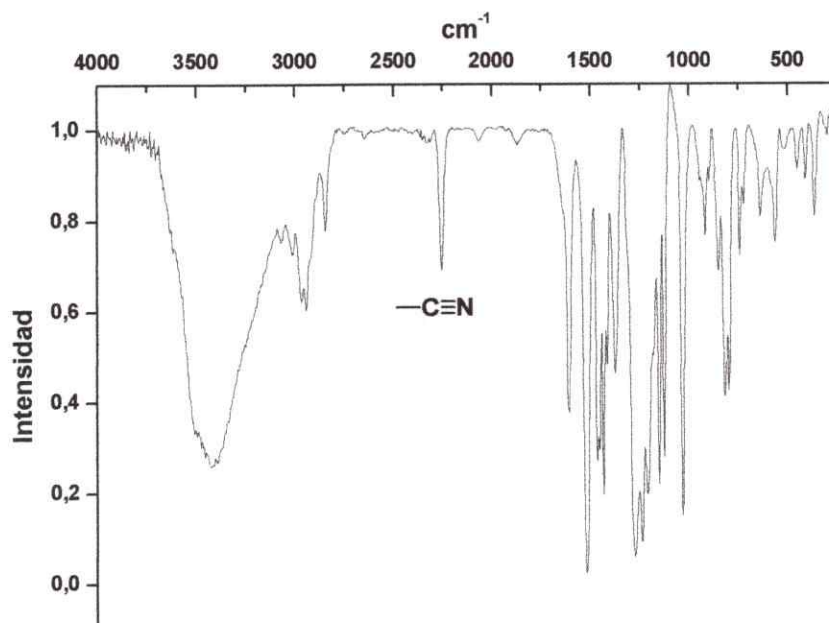
#### 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)acetonitrilo



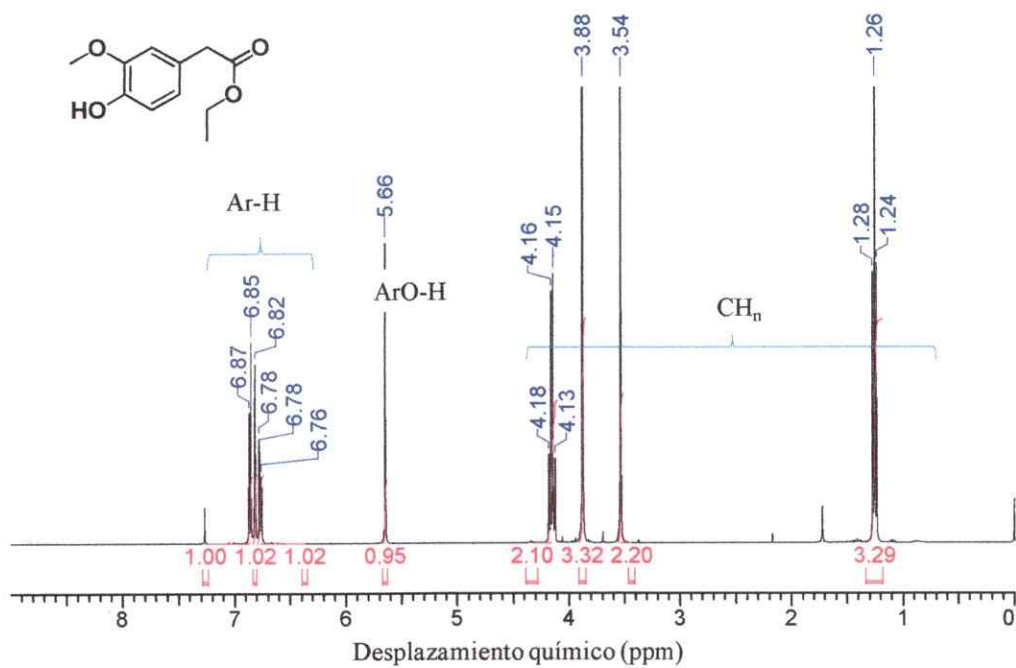
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica *Espectrometría de RMN e infraroja*

#### 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)acetonitrilo



#### 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)acetato de etilo (47a)

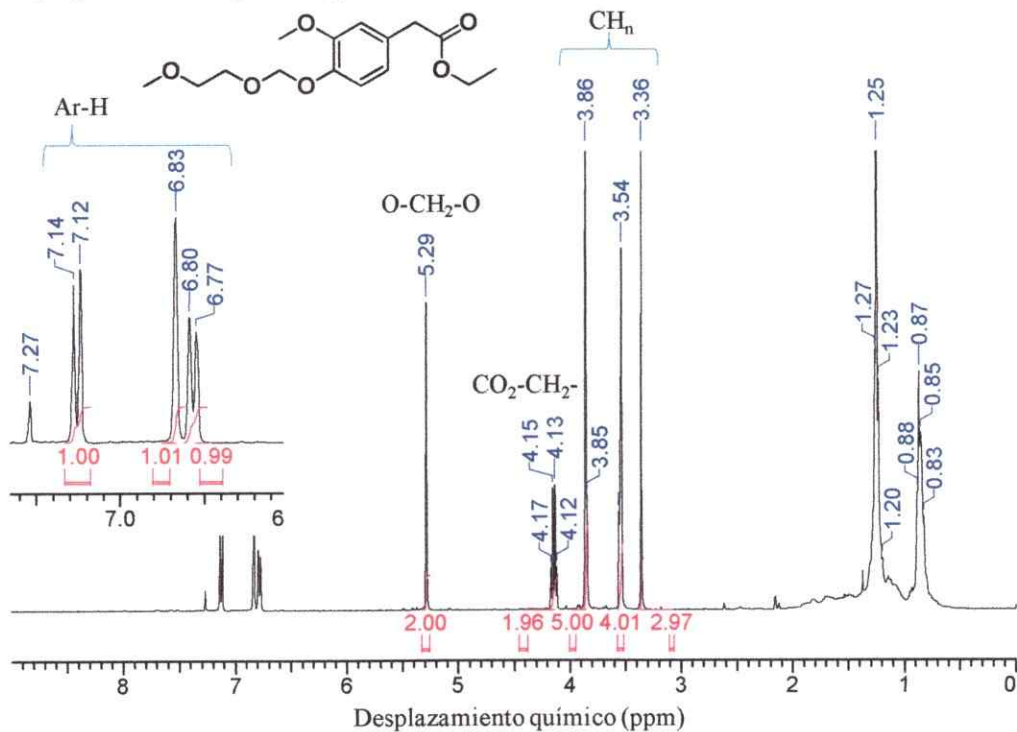




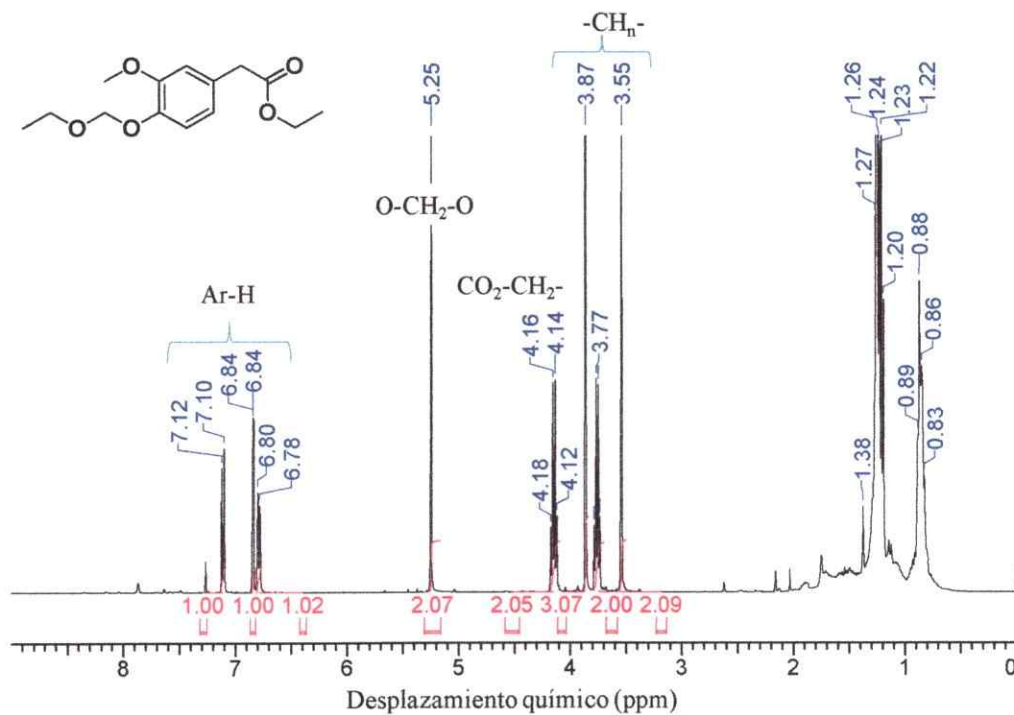
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica \_Espectrometría de RMN e infraroja

**2-(4-((2-metoxietoxi)-metoxi))-3-metoxifenil)acetato de etilo (47c)**



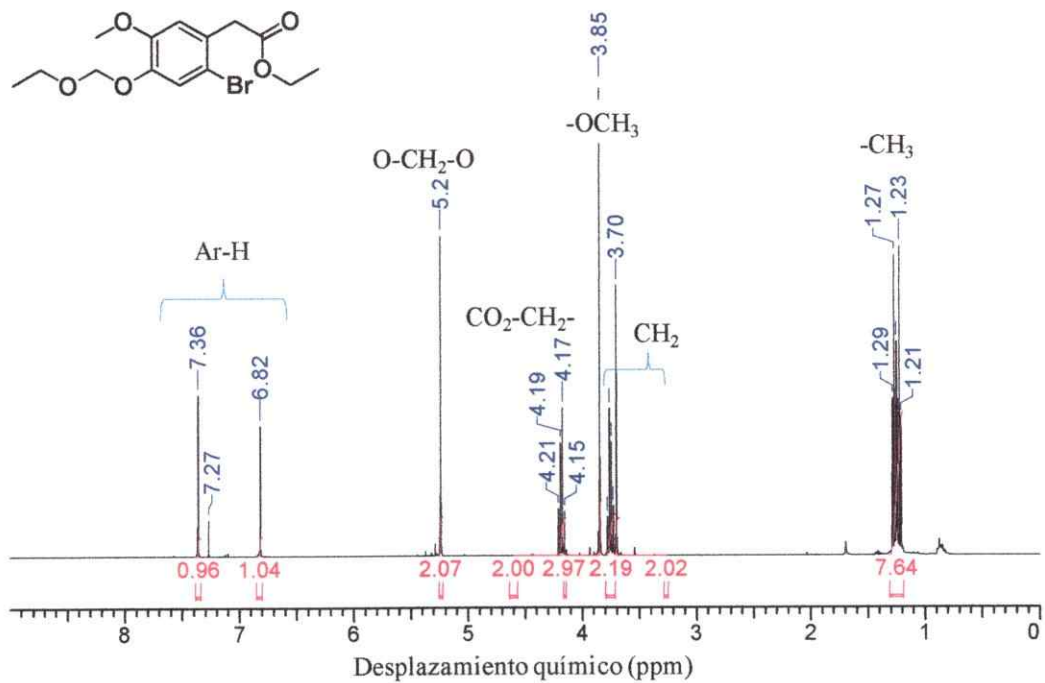
**2-(4-Etoximetoxi-3-metoxifenil)acetato de etilo (47d)**



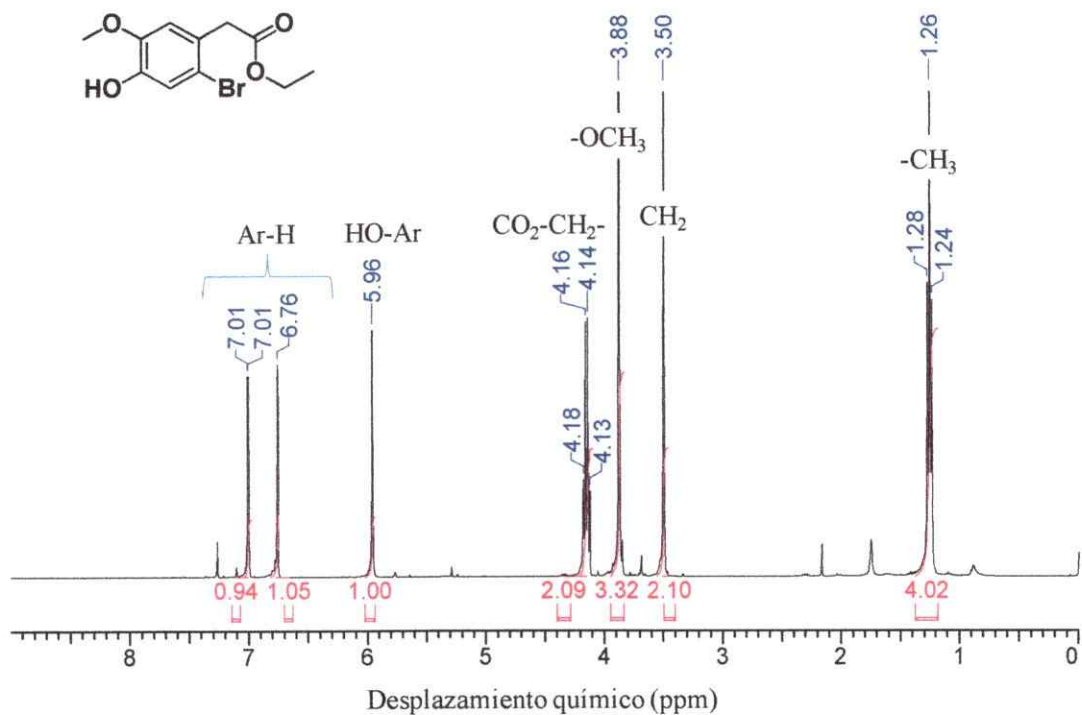
## ANEXO C

### Síntesis Orgánica\_Espectrometría de RMN e infraroja

#### 2-(2-Bromo-4-etoximetoxi-5-metoxifenil)acetato de etilo (48db)



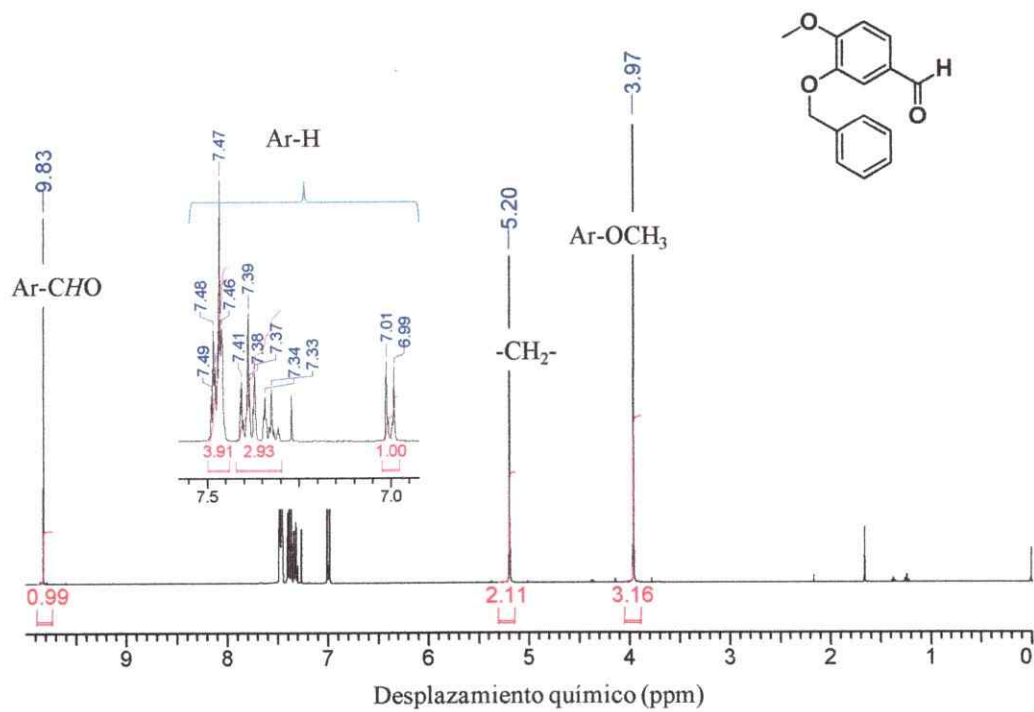
#### 2-(2-Bromo-4-etoximetoxi-5-metoxifenil)acetato de etilo (48ab)



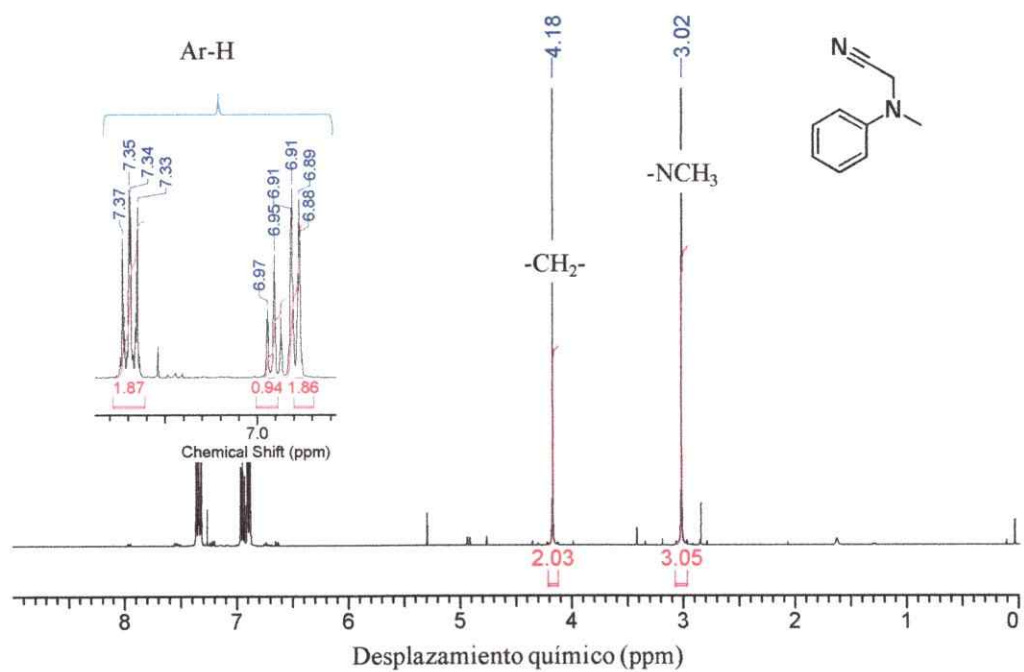
## ANEXO C

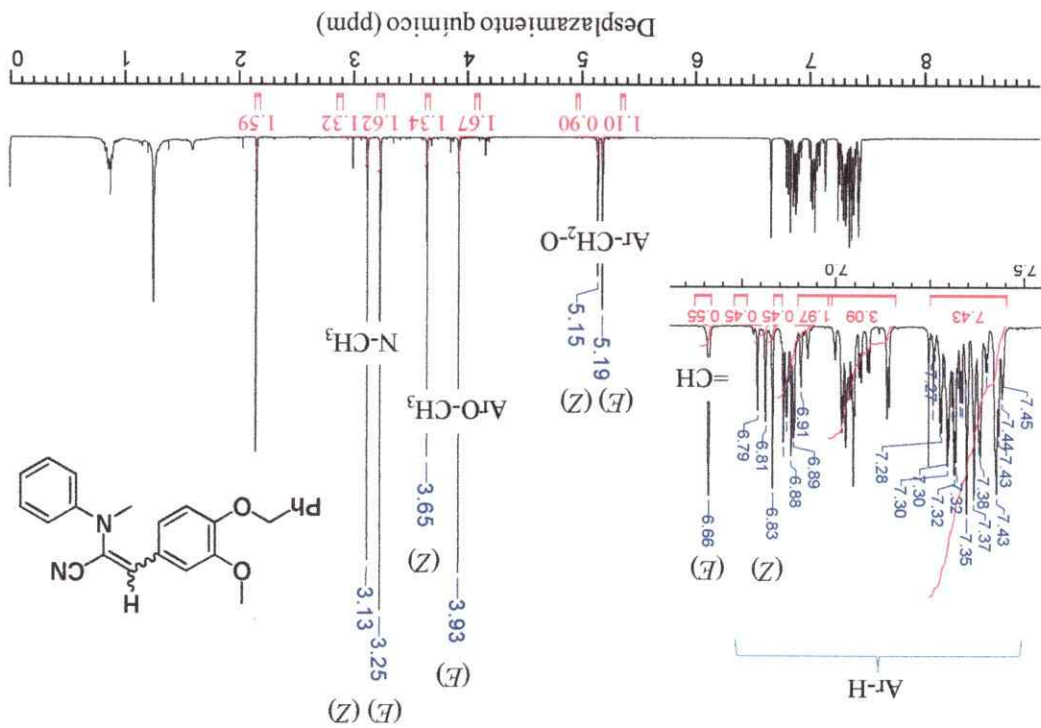
### Síntesis Orgánica \_ Espectrometría de RMN e infraroja

#### 3-Benciloxi-4-metoxibenzaldehido (39b)

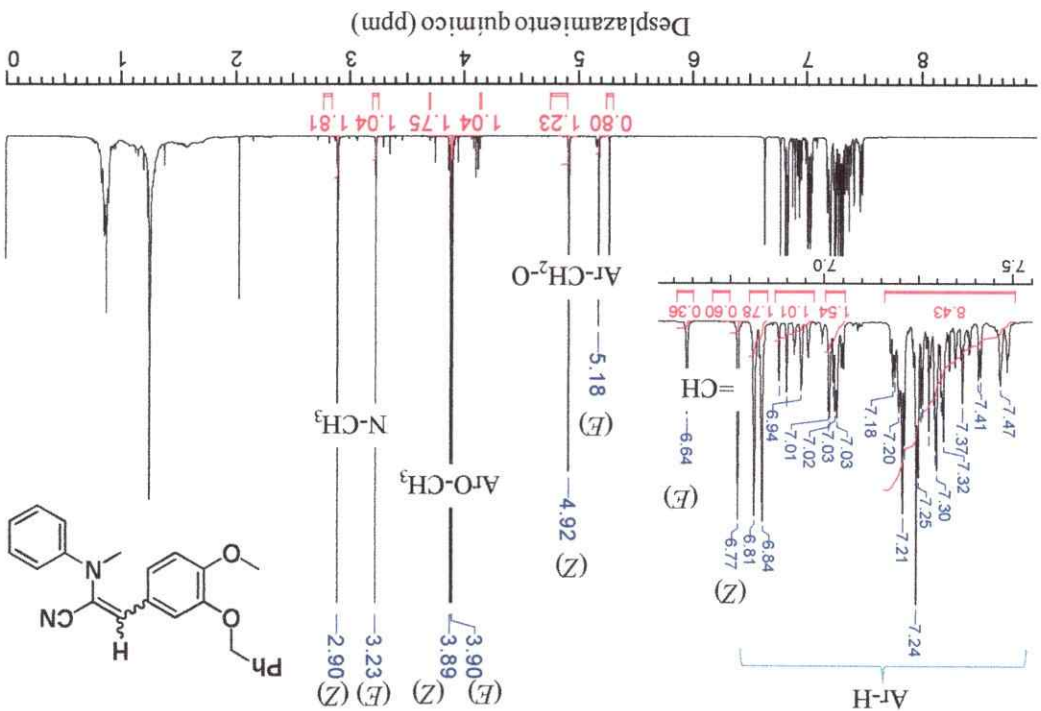


#### $\alpha$ -(N-Metilanilino)acetonitrilo (51)



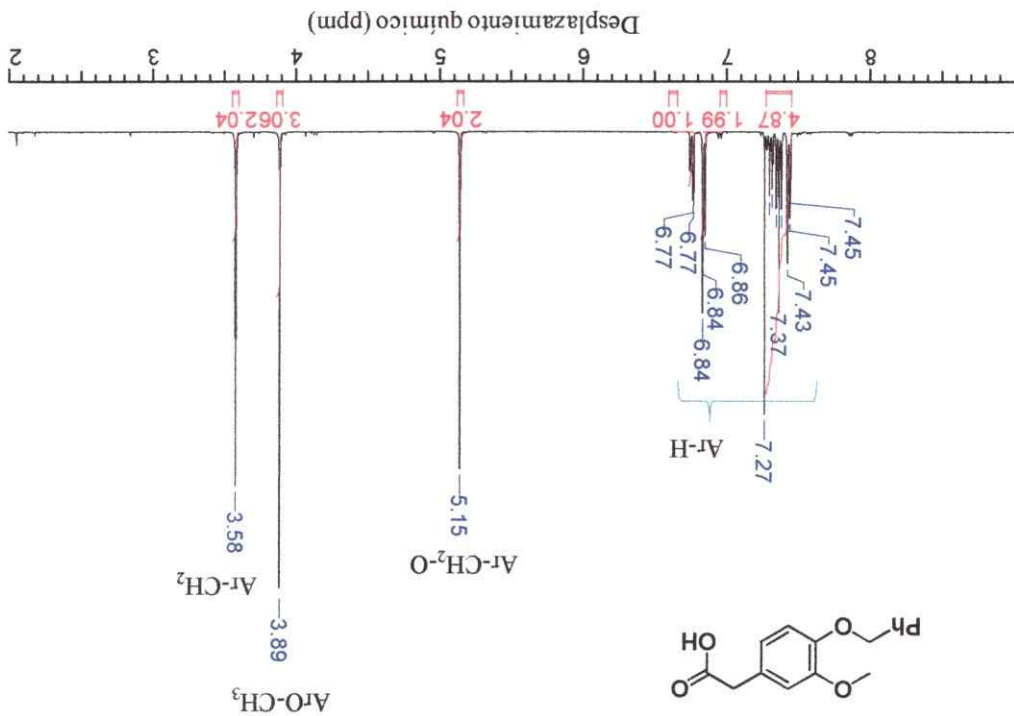


(Z,E)-3-(3-(Benclloxi)-4-metoxifenil)-2-(metil(fenil)amino)acrilonitrilo (50)

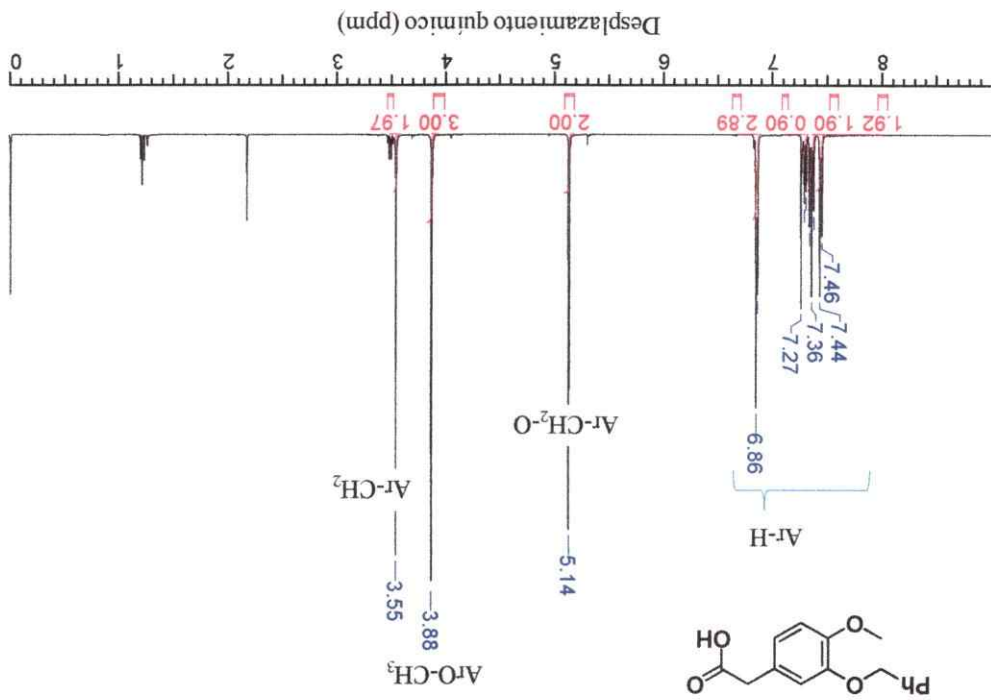


(Z,E)-3-(3-(Benclloxi)-4-metoxifenil)-2-(metil(fenil)amino)acrilonitrilo (41)

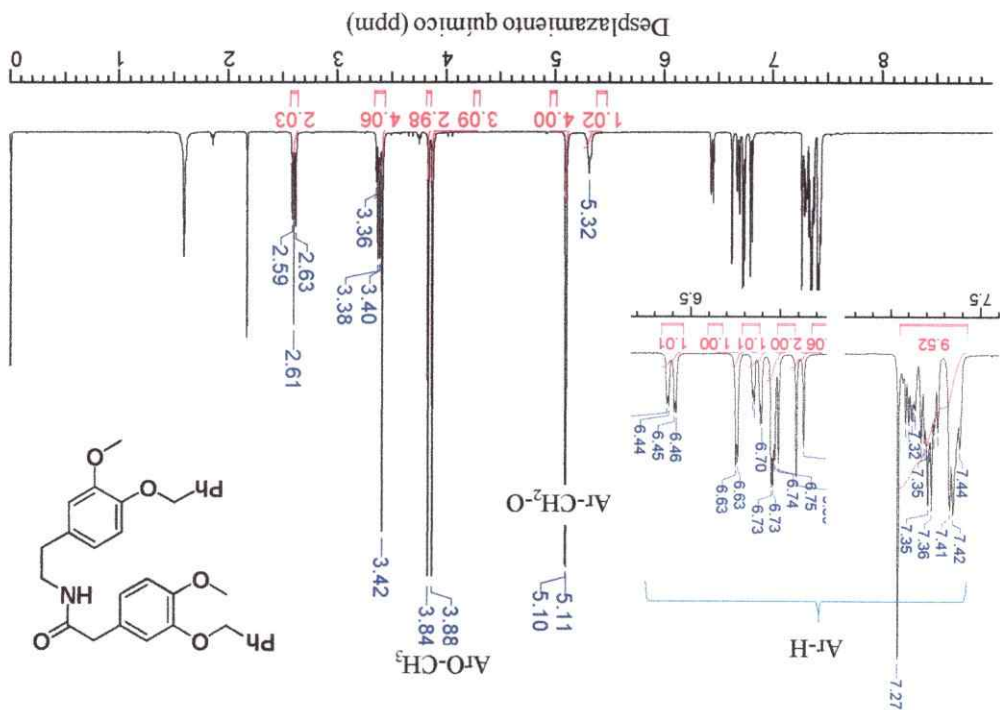
Ácido 2-(4-benciloxi-3-metoxifenil)acético (36b)



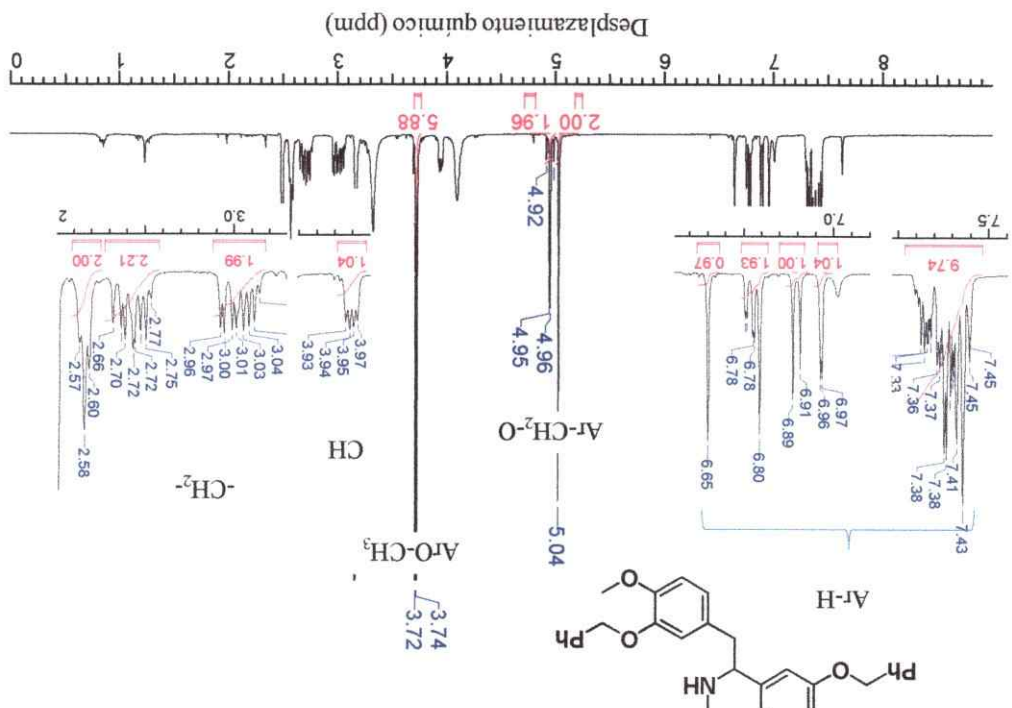
Ácido 2-(3-benciloxi-4-metoxifenil)acético (44b)



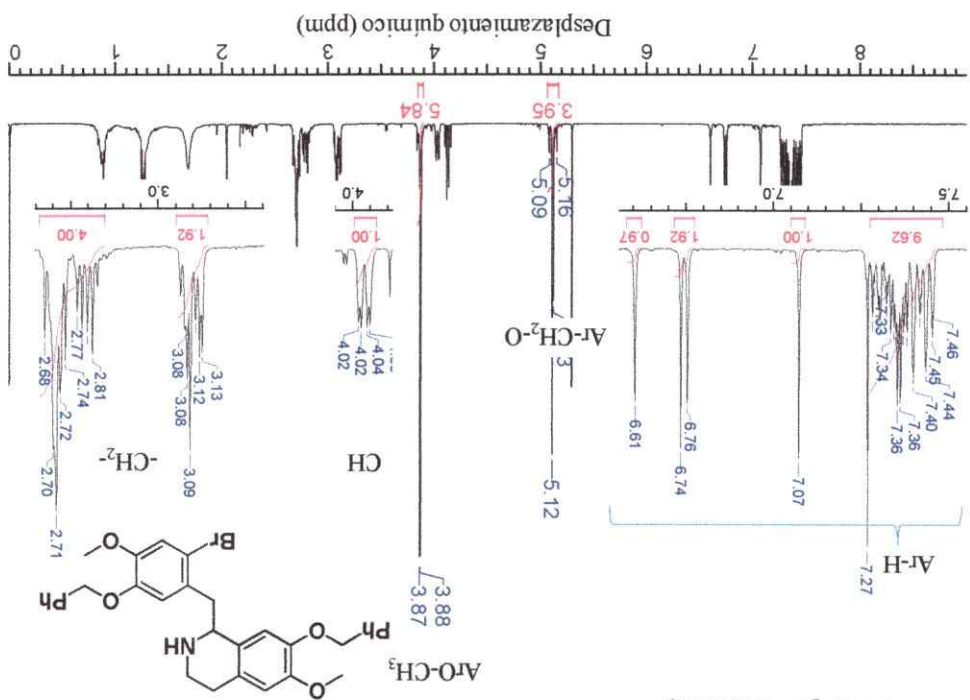
**N-(4-(Beniloxi)-3-metoxifenil)-2-(3-(beniloxi)-4-metoxifenil)acetamida (34b)**



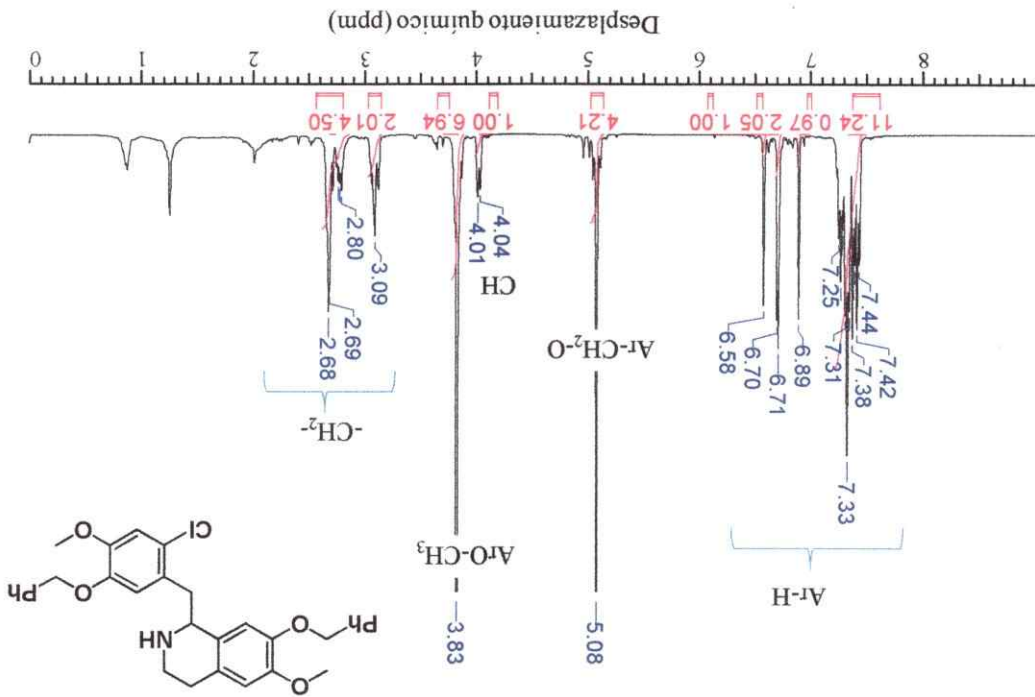
**(±)-7-(Beniloxi)-1-(3-(beniloxi)-4-metoxifenil)-2,3,4-tetrahidroisquinolina (52a)**



(±)-7-(Benclioxi)-1-(3-(benclioxi)-2-(4-metoxibencil)-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisquinolina (52b)

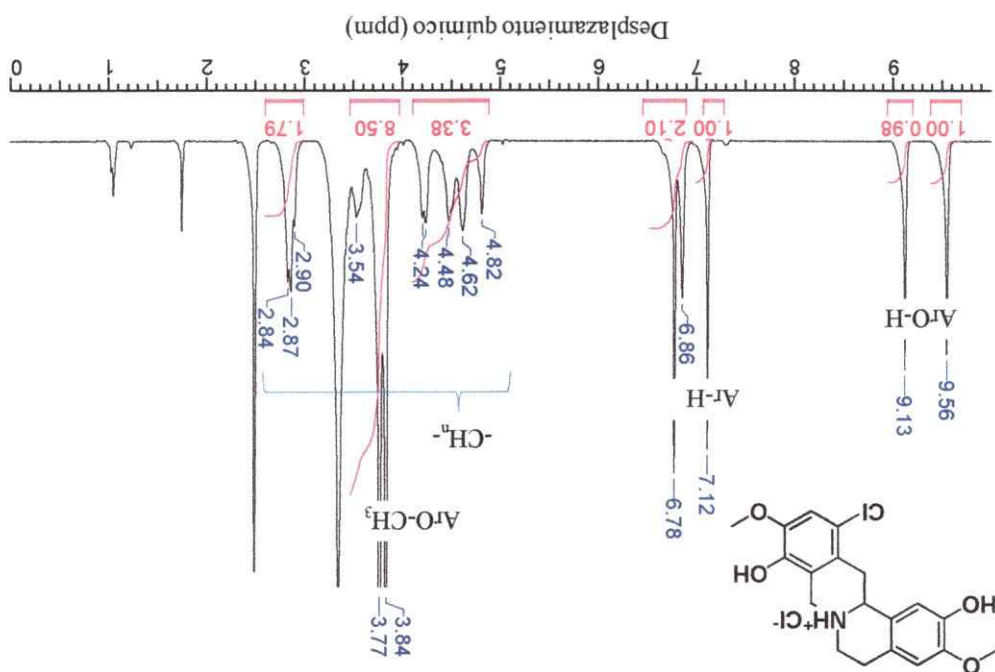


(±)-7-(Benclioxi)-1-(3-(benclioxi)-2-(cloro-4-metoxibencil)-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisquinolina (52c)

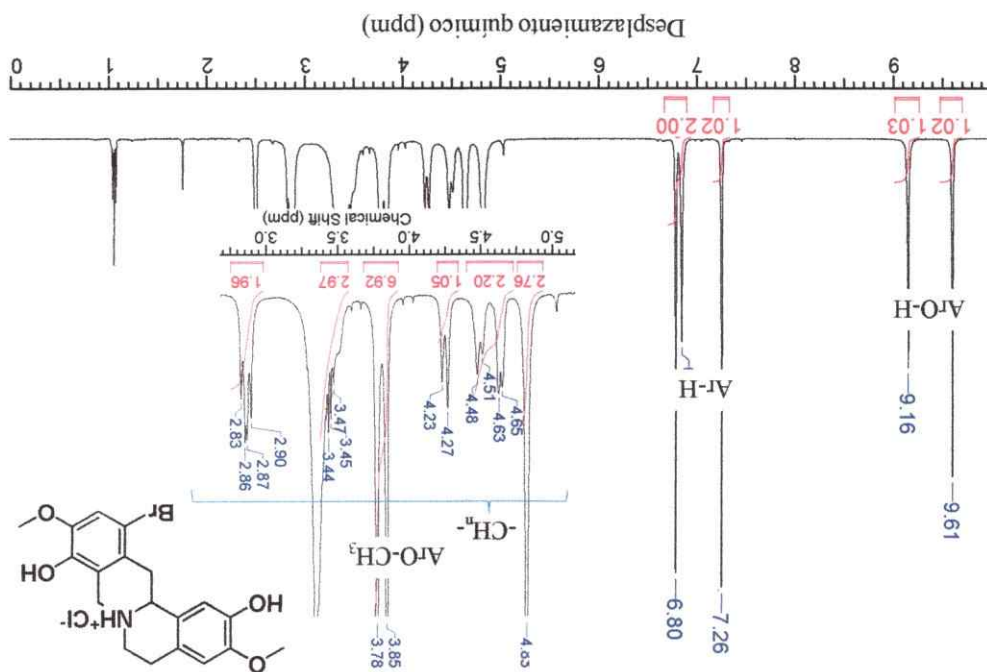






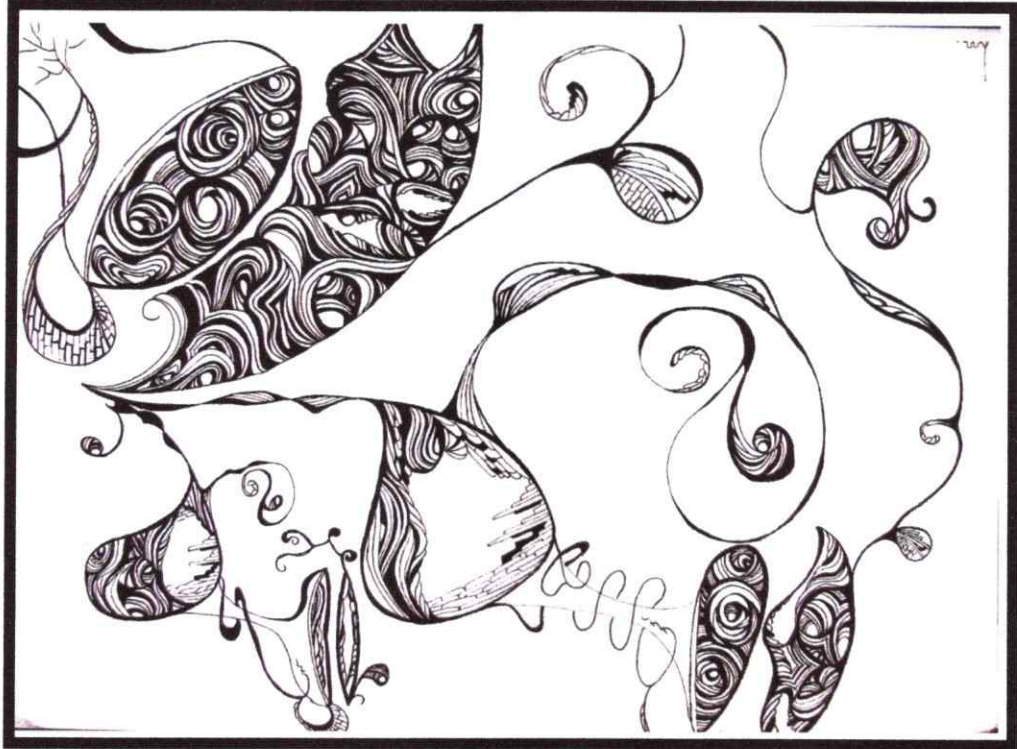


Clorhidrato de (±)12-cloro-2,9-dihidroxi-3,10-dimetoxi-5,6,7,8,13,13a-hexahidrisoquinolino[3,2-a]isquinolina, 12-cloroescoulerina (32c)

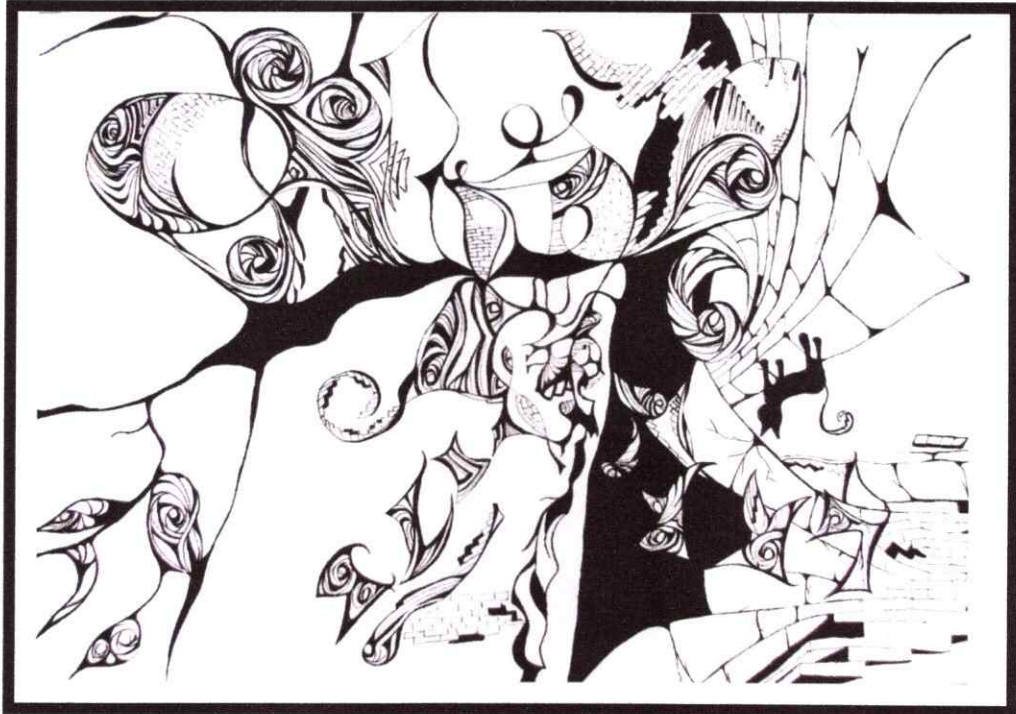


Clorhidrato de (±)12-bromo-2,9-dihidroxi-3,10-dimetoxi-5,6,7,8,13,13a-hexahidrisoquinolino[3,2-a]isquinolina, 12-bromoescoulerina (32b)

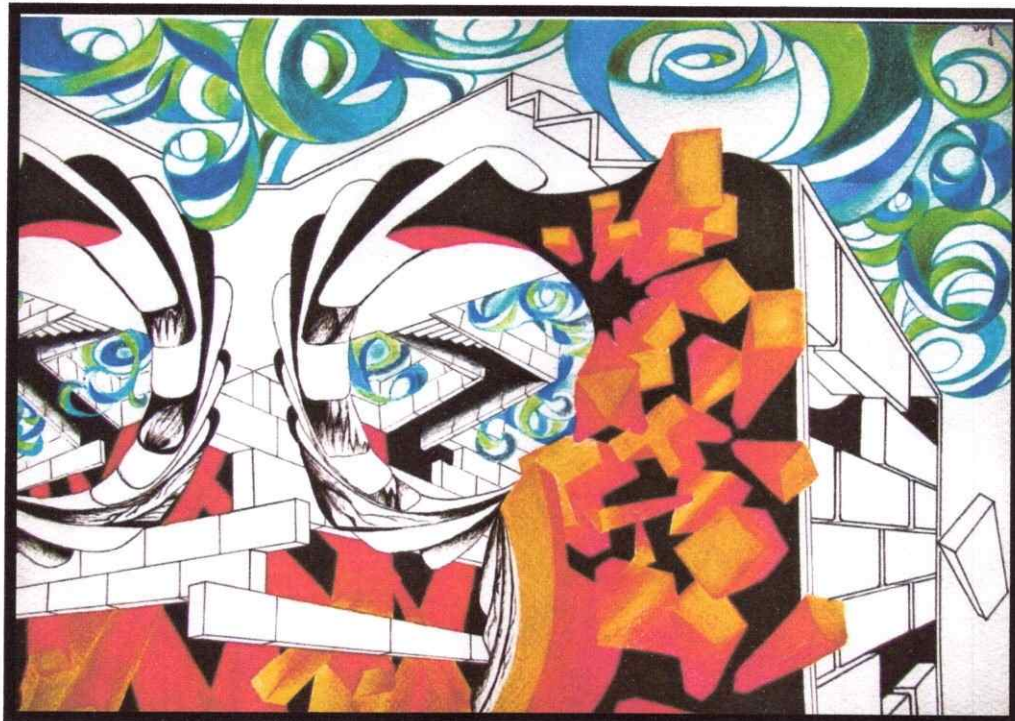
“Una tacita de té” 2014



“Detrás de las paredes” 2014



“Cristales arrojados” 2015



“Mundo l otro lugar” 2014



*"Para salir del laberinto hay que caer" 2016*



*"No lo sé, tal vez... duda" 2016*



"Espiral, un concepto del todo" a diferencia de las otras obras, tiene un origen digital donde se intervinieron imágenes obtenidas por espectroscopia TEM. Esta obra participará una semana después de la entrega de esta tesis en el concurso de NanoArte realizado en el IV Congreso Nacional de Nanotecnología 2016.

*"Espiral, un concepto del todo" 2016*

