



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**



**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica**

**TESIS DOCTORAL**

**Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de  
Derivados Carboxamídicos e Imidamídicos  
como Inhibidores de Óxido Nítrico Sintasa**

*International Doctoral Degree*

Programa de doctorado en Farmacia

**Fabio Arias Bordajandi**

Granada 2020

**Editor:** Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
**Autor:** Fabio Arias Bordajandi  
**ISBN:** 978-84-1306-713-1  
**URI:** <http://hdl.handle.net/10481/65333>

*A mis padres, se lo debo todo a ellos.*



*“Revisando las notas de Melquíades, ahora serenamente, sin la exaltación de la novedad, en prolongadas y pacientes sesiones trataron de separar el oro de Úrsula del cascote adherido al fondo del caldero”*

*Cien años de soledad*

Gabriel García Márquez



# Agradecimientos

Me gustaría aprovechar estas líneas para tener un detalle con todas aquellas personas que, durante estos últimos cinco años, han colaborado en el desarrollo de esta tesis.

Creo que lo más correcto es comenzar por mis directoras, desde el primer momento confiaron en mí y me acogieron en su línea de investigación, valorando siempre mi trabajo y opinión. Dori, con su alegría constante y predisposición a solucionar problemas, y Encarna, siempre disponible para aconsejarme en cualquiera de las facetas de la investigación y la vida en general.

Continuaré con Joaquín Campos, tutor de esta tesis y ejemplo de todo lo que un catedrático debe aspirar a ser: un experto en la materia al que cualquier duda o particularidad le incita a indagar aún más.

A todos los profesores del departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, el haber trabajado en los dos laboratorios de investigación me ha permitido colaborar con la mayoría de ellos, demostrándome que ser un profesional no está reñido con un trato cercano. Recuerdo mis inicios en la investigación con José Antonio, el primer proyecto con Paco, la ayuda de Pepe y Juan (que tanto me imponían por aquel entonces), la sonrisa de Mónica, las visitas sorpresa de Rosario a las 7 de la tarde, la simpatía desmedida de Ana y Olga y la buena convivencia con Carlota y María José. No puedo olvidarme de Ana Pérez quien, durante las clases de 2º de carrera, vio potencial en mí y me aconsejó entrar en el mundo de la investigación.

A Luis, nuestro técnico de laboratorio y Antonio el secretario del departamento, por su trabajo y dedicación.

A mis compañeros de laboratorio que ya son doctores, tuve la suerte de aprender de ellos, me guiaron en los complicados inicios en un laboratorio, compartimos los éxitos y me animaron en las derrotas: Guille, una grandísima persona que quizás tardé demasiado en descubrir, Nerea, con quien he compartido más tiempo durante mi camino investigador, una amiga con mayúsculas, María Dolores y Antonio, soy testigo de la gran pareja que forman, les deseo lo mejor en su aventura americana, y Mariem a quien le debo todos mis conocimientos en el campo de los ensayos biológicos y siempre estuvo dispuesta a solucionar mis dudas.

A los compañeros que aún no han terminado, espero haber sido de ayuda en vuestros inicios en el laboratorio: Espejo, siempre con su gran sentido del humor aunque los resultados nunca acompañen, Pilar, tan valiente a la hora de irse al extranjero y Laura, quien más me ha sorprendido, tus ganas y la fuerza que has demostrado me hacen estar seguro de que conseguirás lo que te propongas.

Sin salir de la Facultad de Farmacia, otros departamentos han colaborado con mi causa: en Farmacología, Juan Duarte y Miguel Romero llevaron a cabo parte de los experimentos presentados en esta tesis, en Bioquímica, Dámaso y Paco Reche me prestaron su laboratorio y material para el preparado de los ensayos biológicos y en Radiofarmacia, Antonio Matilla y Paco realizaron las mediciones de todos mis experimentos. En todos los casos encontré una ayuda inestimable y la mejor de las predisposiciones, algo que hasta cierto punto me resultaba difícil de creer en un ambiente tan competitivo como el nuestro.

Debo agradecer también al Centro de Instrumentación Científica el habilitar todos los medios que cualquier químico orgánico pueda necesitar: en RMN, Ali, Antonio, Laura e Irene siempre estuvieron dispuestos a trabajar con mis muestras (aunque no siempre llevasen 15 mg) y en masas, Samuel mas allá de ser un profesional como no hay otro, puedo considerarlo mi amigo.

Al grupo de investigación FQM-348 de la Facultad de Ciencias, donde trabajé durante un año y medio, con Enrique Álvarez de Manzaneda como director, por ofertar dicha plaza y considerarme válido para ella, y Rachid el químico orgánico más brillante que he conocido y un apasionado de su trabajo.

Per optare alla menzione internazionale, ho dovuto fare un soggiorno da tre mesi a l'Italia. Prima di arrivare, non avevo mai ascoltato la parola Chieti, ma lì mi sono trovato come in la mia casa. Vorrei ringraziare alla professoressa Cristina Maccallini per aprire le porte del suo laboratorio all'Università degli Studi "G. d'Annunzio", e non posso dimenticare gli studenti che accanto a me lavorarono hore e hore, forgiando un'amicizia che è stata la più preziosa dell'esperienza: Vincenzo, Laura, Silvia, Jessica, Ilaria, Valerio, Daniella, Matteo, Stephano, Gianmarco, Anna Teresa, Carmen e Lino.

Dejando el ámbito profesional, otro de los pilares fundamentales para completar esta tesis ha sido el apoyo recibido de mis amigos, me siento

muy afortunado de haber coincidido con gente maravillosa, capaz de amenizar el tiempo que no estaba en el laboratorio.

De mi paso por ciencias, mas allá de todo lo aprendido y los artículos que se han publicado, saco un grupo de amigos único, gente divertida e inteligente, con la que congenié desde el primer momento. Pili, que me dio las claves para sobrevivir en el laboratorio, Álex, alguien que siempre tiene algo interesante que compartir contigo, Fermín, de quien heredé el puesto de laboratorio y espero que nada más, Pepo, no busquéis en SciFinder, preguntadle a él, Chady, personaje ecléctico al que no me queda más remedio que admitir como mi mejor pupilo y Juani, con quien he compartido las penas de una tesis al filo de la navaja, todo lo bueno que pueda decir de ti se me queda corto. En las pausas recargar fuerzas en la Menorca conocí a Pablillo, sigiloso y letal en sus intervenciones, Aida, siempre tan inocente, Edu, maestro de la ofensa y el picante, Rafa, lo más granaino y vinagres que te puedes encontrar, pero imposible no quererlo, Nashyra, a quien considero que mejor entiende mi humor y Sandra, un cielo de persona capaz de funcionar en multitarea y tener tiempo para preocuparse por ti.

Siempre recordaré la alegría que desprende Stefania, mi colombiana favorita y todas las “polas” que tomamos mientras compartíamos pedacitos de nuestras culturas. Gracias a ella también pude conocer mejor a Jessica, mi “best friend” del desconfinamiento y su novio Alex quien me ha devuelto la esperanza para ser farmacéutico.

De la carrera mantengo amistades que se han fortalecido con el paso del tiempo: mis princesas malvadas Maria Gmu, Arre, Lourdes, Enrique, Manu y Elisa, nuestras casas rurales, cumpleaños cuando no tocan y despedidas improvisadas han sido siempre mis eventos favoritos del año. No puedo olvidarme de Gloria, a la que considero prácticamente mi hermana granadina.

Mi paso por el colegio mayor Santa Cruz la Real marcó mi carácter, conviví con multitud de personas diferentes y encontré amigos para toda la vida. Nombraré algunos: Juan Tomás, Juan Antonio, Guada, Escri, Olmo, Gustavo, Kiko, Comunión, Jesús Damián, Archilla, Adrián y por extensión Esther aunque estoy seguro de que me olvido de alguien.

En la etapa del instituto destaco a los míticos, Pepe, Ana, Noelia y Popi mi paso por el I.E.S. Alquivira no hubiese sido el mismo sin vosotros.

En mi pueblo natal, la Puebla de Don Fadrique, conservo mis amistades más longevas, José y Josué, gracias por acompañarme todo este tiempo, mis buenos amigos Lucas y Nayara, que siempre se preocuparon por mantener mis lazos con el pueblo, gracias por vuestra paciencia.

Por último, quisiera cerrar este apartado mostrando agradecimiento a mi familia, me han demostrado que siempre podré confiar en ellos, su amor incondicional y apoyo perpetuo han sido imprescindibles para completar esta investigación. Carmen, mi hermana pequeña, la alegría de la casa, mi némesis en la infancia que, como giro de guion totalmente previsible, se convirtió en mi mejor aliada, ojalá tuviera tu facilidad para mostrar lo mucho que nos queremos. Y mis padres, Fabio y Rosario, quienes me dieron la vida, me educaron y han hecho posible todo lo que he conseguido. Quizás no se lo diga lo suficiente, pero los quiero, y espero que sepan que todo lo bueno que la gente ve en mi, es gracias a ellos. Dedicarles esta memoria es lo mínimo que podía hacer.

## Índice

Diccionario de Abreviaturas .....	5
<b>1. Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Óxido Nítrico .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Historia.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Óxido Nítrico Sintasa .....</b>	<b>12</b>
1.3.1. Biosíntesis .....	12
1.3.2. Clasificación .....	12
1.3.3. Estructura.....	14
1.3.4. Dimerización .....	17
1.3.5. Ciclo catalítico del hierro.....	19
<b>1.4. Mecanismos de acción.....</b>	<b>20</b>
1.4.1. Necrosis y apoptosis derivadas de NO .....	21
1.4.2. Citoprotección del NO.....	22
1.4.3. El NO como neurotransmisor.....	23
<b>1.5. Regulación de la actividad .....</b>	<b>25</b>
1.5.1. Feedback negativo .....	25
1.5.2. Calcio y CaM.....	25
1.5.3. Fosforilaciones .....	26
1.5.4. Proteína inhibidora de NOS .....	26
1.5.5. Proteínas de shock térmico 70 y 90 .....	26
1.5.6. Kalirinina .....	27
<b>1.6. Trastornos neurodegenerativos.....</b>	<b>27</b>
1.6.1. Neuroinflamación .....	27
1.6.2. Enfermedad de Alzheimer .....	29
1.6.3. Enfermedad de Parkinson.....	34
<b>1.7. Otras patologías .....</b>	<b>37</b>
<b>1.8. Antecedentes químicos .....</b>	<b>37</b>
1.8.1. Inhibidores competitivos del sustrato .....	38
1.8.2. Inhibidores competitivos de la coordinación Fe-Hemo .....	49
1.8.3. Antagonistas de BH <sub>4</sub> .....	50
1.8.4. Antagonistas de CaM .....	54
1.8.5. Inactivadores de nNOS.....	55
1.8.6. Inhibidores duales de nNOS y otras dianas.....	57
1.8.7. Inhibidores iNOS derivados de la naturaleza .....	59
1.8.8. Inhibidores iNOS amidínicos .....	64
1.8.9. Inhibidores de la dimerización iNOS .....	65

1.8.10.	Antecedentes de nuestro grupo de investigación .....	67
<b>2.</b>	<b>Objectives .....</b>	<b>71</b>
<b>3.</b>	<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1.</b>	<b>Síntesis química.....</b>	<b>77</b>
3.1.1.	Condiciones generales .....	77
3.1.2.	Síntesis de la Familia A .....	78
3.1.3.	Síntesis de la Familia B .....	90
3.1.4.	Síntesis de la Familia C .....	98
3.1.5.	Síntesis de la Familia D.....	118
3.1.6.	Síntesis de la Familia E .....	122
3.1.7.	Síntesis de la Familia F .....	125
<b>3.2.</b>	<b>Evaluación biológica .....</b>	<b>129</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>133</b>
<b>4.1.</b>	<b>Familia A .....</b>	<b>137</b>
4.1.1.	Diseño molecular .....	137
4.1.2.	Síntesis química.....	138
4.1.3.	Análisis espectroscópico .....	139
4.1.4.	Estudios biológicos.....	149
<b>4.2.</b>	<b>Familia B.....</b>	<b>152</b>
4.2.1.	Diseño molecular .....	152
4.2.2.	Síntesis química.....	152
4.2.3.	Análisis espectroscópico .....	153
4.2.4.	Estudios biológicos.....	161
<b>4.3.</b>	<b>Familia C.....</b>	<b>162</b>
4.3.1.	Diseño molecular .....	162
4.3.2.	Síntesis química.....	162
4.3.3.	Análisis espectroscópico .....	164
4.3.4.	Estudios biológicos.....	187
<b>4.4.</b>	<b>Familia D .....</b>	<b>188</b>
4.4.1.	Diseño molecular .....	188
4.4.2.	Síntesis química.....	189
4.4.3.	Análisis espectroscópico .....	189
4.4.4.	Estudios biológicos.....	195
<b>4.5.</b>	<b>Familia E.....</b>	<b>196</b>
4.5.1.	Diseño molecular .....	196
4.5.2.	Síntesis química.....	197
4.5.3.	Análisis espectroscópico .....	197
4.5.4.	Estudios biológicos.....	202
<b>4.6.</b>	<b>Familia F.....</b>	<b>202</b>

4.6.1.	Diseño molecular .....	202
4.6.2.	Síntesis química.....	203
4.6.3.	Análisis espectroscópico .....	205
4.6.4.	Estudios biológicos.....	209
<b>5.</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>211</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>215</b>
<b>7.</b>	<b>Anexo .....</b>	<b>237</b>



## Diccionario de Abreviaturas

<b>ACh:</b>	Acetilcolina.
<b>ACV:</b>	Accidente cerebro-vascular.
<b>aMK:</b>	<i>N</i> -Acetil-5-metoxikinurenamina.
<b>APOE:</b>	Apolipoproteína E.
<b>AUC:</b>	Area Under the Curve (Área bajo la curva).
<b>BH<sub>4</sub>:</b>	Tetrahidrobiopterina.
<b>BHE:</b>	Barrera Hemato-Encefálica.
<b>BSA:</b>	Bovine Serum Albumine (Albúmina de suero bovino).
<b>CaCaM:</b>	Complejo calcio-calmodulina.
<b>CaM:</b>	Calmodulina.
<b>DTT:</b>	DL-ditiotreitol.
<b>EA:</b>	Enfermedad de Alzheimer.
<b>EDRF:</b>	Endothelium-Derived Relaxing Factor (Factor relajante del endotelio).
<b>EGTA:</b>	Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético.
<b>EH:</b>	Enfermedad de Huntington.
<b>eNOS:</b>	endothelial Nitric Oxide Syntase (Isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa).
<b>EP:</b>	Enfermedad de Parkinson.
<b>FAD:</b>	Flavín-adenín dinucleótido.
<b>FMN:</b>	Flavín mononucleótido.
<b>GSH:</b>	Glutation.
<b>HEPES:</b>	Ácido <i>N</i> -(2-hidroximetil)piperazin- <i>N'</i> -(2-etanosulfónico).
<b>HMBC:</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples).
<b>HSQC:</b>	Heteronuclear Single-Quantum Correlation (Correlación heteronuclear cuántica simple).
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferón gamma.
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b>	Interleuquina-1 $\beta$ .
<b>iNOS:</b>	inducible Nitric Oxide Syntase (Isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa).
<b>L-NAME:</b>	<i>N</i> <sup>6</sup> -nitro-L-arginina metil éster.
<b>L-NOHA:</b>	<i>N</i> <sup>6</sup> -hidroxi-L-Arginina.
<b>LPS:</b>	Lipopolisacárido.
<b>LSIMS:</b>	Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (Espectroscopia líquida de masas de iones secundarios).
<b>MIF:</b>	Molecular Interaction Fields (Campos de interacción molecular).
<b>MS:</b>	Mass Spectrometry (Espectroscopia de masas).
<b>mtNOS:</b>	mitochondrial Nitric Oxide Syntase (Isoforma mitocondrial de la óxido nítrico sintasa).

**NADPH:** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

**NMDA:** Ácido N-metil-D-aspartico.

**nNOS:** neuronal Nitric Oxide Syntase (Isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa).

**NO:** Nitric Oxide (Óxido nítrico).

**NOS:** Nitric Oxide Syntase (Óxido nítrico sintasa).

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**pcSN:** Parte compacta de la sustancia nigra.

**Pf:** Punto de fusión.

**PIN:** Proteína inhibidora de la NOS.

**REA:** Relación Estructura Actividad.

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

**RNS:** Reactive Nitrogen Species (Especies reactivas de nitrógeno).

**RONS:** Reactive Oxygen and Nitrogen Species (Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno).

**ROS:** Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno).

**Rto:** Rendimiento.

**SNC:** Sistema Nervioso Central.

**TLC:** Thin Layer Chromatographie (Cromatografía en capa fina).

**TNF- $\alpha$ :** Tumoral Necrosis Factor alpha (Factor de necrosis tumoral alfa).

**Tris-HCl:** Hidrocloruro de tris-(hidroximetil)-aminometano.

# 1. Introducción



## 1.1. Óxido Nítrico

El óxido nítrico es una molécula heterodiatómica de fórmula molecular NO, posee un electrón desapareado (por lo que se comporta como un radical libre) y en condiciones normales es un gas incoloro.

En el organismo, gracias a su pequeño tamaño, carecer de carga formal y alta solubilidad, puede difundir fácilmente a través de membranas y en espacios intra e intercelulares. Debido a su alta reactividad, tiene una vida media muy corta.

Desde el punto de vista fisiológico está involucrado como segundo mensajero en la relajación del musculo liso, control de la presión sanguínea, inflamación, activación del sistema inmunitario y neurotransmisión.

## 1.2. Historia

La existencia del óxido nítrico como compuesto químico es conocida desde los inicios del siglo XIX. En los albores de la química moderna ya era utilizado en reacciones para comprender el comportamiento de los derivados del nitrógeno y reacciones de óxido-reducción, llegando a aparecer en experimentos de ilustres científicos como Gay-Lussac.

No obstante, descubrir su implicación a nivel biológico no fue posible hasta entrada la década de 1970, debido principalmente a las propiedades químicas tan distintas del resto de mediadores en el organismo identificados hasta esa fecha.

Todo comenzó en la Universidad del Estado de Nueva York, donde el profesor de Farmacología Robert F. Furchgott se encontraba estudiando

la relajación de los vasos sanguíneos y la forma en la que la acetilcolina (ACh) intervenía en el proceso. Al comienzo de su investigación ya era conocida la función neurotransmisora de la ACh, a pesar de ello, los resultados que obtuvo Furchgott fueron diametralmente opuestos a los esperados: los tejidos preparados para sus ensayos, tras el estímulo con ACh, se contraían en vez de relajarse. Indagando en los motivos de este fenómeno, llegó a la conclusión de que la preparación del tejido para sus ensayos dañaba una parte clave para la relajación del músculo: el endotelio.

La diferencia que presentan los vasos sanguíneos del resto de la musculatura lisa es la presencia del endotelio recubriendo su capa interior. Furchgott desarrolló un experimento para comprobar la función de este tejido en el sistema circulatorio: al retirar el endotelio sin dañar el resto de la estructura vascular, los vasos sanguíneos seguían contrayéndose tras un estímulo con ACh. No obstante, al repetir el experimento con una sección de aorta sin endotelio adherida a otra con endotelio en un modelo “sándwich”, se producía una relajación tras la estimulación. Esto hizo plantearse la existencia de un segundo mensajero que aparecía en presencia de ACh, una sustancia desconocida que sería capaz de difundir a través de los tejidos y que obviamente se producía en el endotelio. Decidieron bautizarlo “factor relajante derivado del endotelio” o EDRF, por sus siglas en inglés.<sup>1</sup>

A partir de ese momento, los esfuerzos de la comunidad científica se centraron en descubrir cuál era la naturaleza de esa sustancia.

Tomó entonces el testigo Ferid Murad, quien fijó su atención en un grupo de medicamentos para la angina de pecho descubiertos hacía más de un siglo: la nitroglicerina y el nitrito de amilo. Con anterioridad ya había desentrañado partes de su mecanismo de acción: estos medicamentos activaban la guanilato ciclasa, aumentando el cGMP, provocando una fuerte vasodilatación periférica que reducía la resistencia de los vasos y el retorno venoso. No obstante, el motivo por el que se desencadenaba esa vía le era desconocido. La hipótesis de Murad se basaba en la posibilidad de que estos medicamentos se descompusieran y liberasen NO en el torrente sanguíneo. Para comprobarlo decidió burbujear NO gaseoso en una preparación de tejido con guanilato ciclasa, midiendo posteriormente la presencia de cGMP, un aumento significativo frente a los ensayos control determinó que su teoría era cierta.<sup>2</sup>

Aunque estos dos descubrimientos mostraban una misma respuesta fisiológica, la conexión entre el endotelio y los medicamentos vasodilatadores no estaba completa, faltaba por identificar si el EDRF y el NO eran la misma sustancia. Fue entonces cuando entró en escena Louis Ignarro, el cual, en un congreso científico en la Clínica Mayo en 1986 (al que también asistió Furchgott), presentó dos espectros de absorción de la hemoglobina: uno unido al factor endotelial y otro a NO, siendo ambos idénticos entre sí.<sup>3</sup>

A principios de 1990, en los laboratorios de la Universidad Johns Hopkins, fue aislada por primera vez la enzima responsable de la formación del NO a nivel biológico: la óxido nítrico sintasa (NOS). Gracias al trabajo de David S. Bredt y Solomon H. Snyder, además de purificar monómeros de esta enzima a partir de cerebelo de ratón, consiguieron identificar algunos de los cofactores clave para su actividad biológica.<sup>4</sup>

Aunque en sus inicios esta teoría contaba con más escépticos que adeptos, y la investigación supuso un gran reto para todos los científicos implicados, el reconocimiento internacional alcanzó su culmen con el premio Nobel de Medicina del año 1998 a Robert F. Furchgott, Ferid Murad y Louis Ignarro, por sus descubrimientos acerca de la implicación del óxido nítrico como molécula mensajera en el sistema cardiovascular.<sup>5</sup>

La entrega de este premio no estuvo exenta de polémica, no por falta de mérito de los galardonados, sino por dejar en el olvido el trabajo de Sir Salvador Moncada.<sup>6</sup> Este científico, de origen hondureño y nacionalidad británica, fue el responsable de elucidar la ruta metabólica por la cual se sintetiza el NO. Además, de su laboratorio salieron gran parte de las primeras informaciones sobre los efectos del NO en los sistemas circulatorio y nervioso, y la influencia que ejerce esta molécula en el cáncer.

Desde que se hizo patente la importancia del NO en el organismo hasta la actualidad, el goteo de nuevos descubrimientos sobre el óxido nítrico ha sido constante. Esto puede verse fácilmente reflejado en el número de publicaciones al respecto, pasando de unas decenas de artículos antes de 1986, a un desarrollo exponencial que a día de hoy alcanza los 170 mil resultados.<sup>7</sup>

En estos 35 años se ha aclarado en gran medida el papel fisiológico, patológico y farmacológico del NO para el ser humano, permitiendo abrir

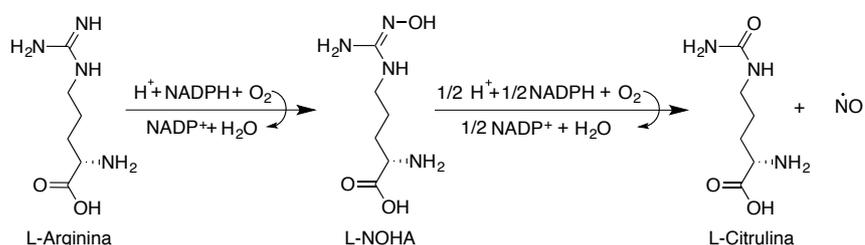
numerosas vías de investigación para el estudio de enfermedades y sus posibles tratamientos.

### 1.3. Óxido Nítrico Sintasa

Las enzimas de la familia de las óxido nítrico sintasas son las encargadas de catalizar a nivel biológico la reacción de formación de NO.

#### 1.3.1. Biosíntesis

A pesar de que puede aparecer como subproducto de algunas reacciones en el organismo, la inmensa mayoría del NO proviene de la transformación de L-arginina (L-Arg) a L-citrulina (L-Cit), consumiendo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y O<sub>2</sub>. La estequiometría de la reacción se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Biosíntesis de NO.

En primer lugar, la L-Arg se oxida a N<sup>ω</sup>-hidroxi-L-Arg (L-NOHA) consumiendo 1 equivalente de NADPH, H<sup>+</sup> y O<sub>2</sub>; este intermedio de reacción vuelve a sufrir el mismo proceso oxidativo para formar finalmente L-Cit y NO. En esta segunda fase, la estequiometría es más confusa, se consumen 0.5 equivalentes de NADPH y H<sup>+</sup> junto con un equivalente de O<sub>2</sub>, la explicación más viable es el consumo de NADPH desacoplado de esta reacción cuando el aminoácido no está presente.

Las concentraciones en las que puede aparecer el NO en la célula pueden variar entre: bajas (0.2 – 2.0 nM) en condiciones fisiológicas, moderadas (2 – 20 nM) en condiciones de respuesta inmunitaria o inflamación y, excepcionalmente, pueden aparecer elevadas (20 – 200 nM).<sup>8</sup>

#### 1.3.2. Clasificación

En los mamíferos existen tres isoformas que reciben su nombre por el lugar en el que se descubrieron por primera vez: la neuronal o nNOS, la

inducible o iNOS y la endotelial o eNOS. A continuación describiremos cada una de ellas siguiendo las pautas de Geller y Billiar.<sup>9</sup>

La isoforma neuronal (nNOS) fue la primera en ser descubierta, es una isoforma de carácter constitutivo cuya actividad depende de la concentración de calcio intracelular. Genéticamente hablando se encuentra codificada en el cromosoma 12 por unas 160.8 kilobases, que se traducen en 1434 aminoácidos por monómero. Preferentemente se localiza en las neuronas del sistema nervioso central (SNC), aunque aparece también en los demás tipos de neuronas, y en células musculares cardíacas y esqueléticas. La localización subcelular la determina una secuencia PDZ que solo posee esta isoforma en el extremo N-terminal, habitualmente es en el citosol, aunque también se ha detectado en las membranas plasmáticas y en el núcleo.<sup>10</sup>

La isoforma endotelial (eNOS), al igual que nNOS, es constitutiva y dependiente de la concentración de calcio. Esta enzima está formada por 1203 aminoácidos por monómero que se encuentran codificados por 21 kilobases en el cromosoma 7. Se puede encontrar en las células endoteliales, concentrada preferentemente en el aparato de Golgi y en pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática llamadas caveolas. Esta diferencia respecto a las otras isoformas se debe a acilaciones en el extremo N-terminal, concretamente miristolación de Gly2 y palmitoilación de Cys15 y Cys25.<sup>11</sup>

Por último, la isoforma inducible (iNOS) solo se expresa después de una inducción transcripcional y de forma independiente a la concentración de calcio intracelular, debido a que el complejo calcio-calmodulina (CaCaM) forma parte de su estructura. Los estímulos que desencadenan la producción de esta enzima pueden ser endotoxinas, como el lipopolisacárido (LPS), o mediadores pro-inflamatorios como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).<sup>12</sup> Es la isoforma más pequeña con 1153 aminoácidos por monómero, codificados en 37 kilobases del cromosoma 17. Aunque inicialmente se descubriera en macrófagos, es capaz de ser expresada por casi cualquier célula del organismo, de forma preferente se localiza en el citosol de las células. Esta isoforma es capaz de producir 10<sup>3</sup> veces más NO por unidad de tiempo que cualquiera de las otras.<sup>13</sup>

Se ha debatido la existencia de una cuarta isoforma, la mitocondrial o mtNOS, sin embargo, la falta de consistencia en los artículos respecto a su caracterización y resultados de actividad, permiten la aparición de

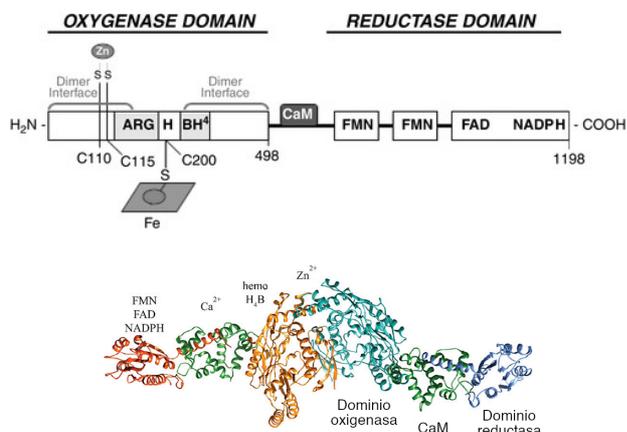
argumentos de peso en su contra; por ejemplo, no ha podido encontrarse ninguna proteína similar codificada en el genoma mitocondrial, tampoco existen transportadores activos para ella en la membrana, y se sospecha que los casos en los que se han detectado indicios de NO en las mitocondrias aisladas, deriven de cualquiera de las otras tres isoformas adheridas a la membrana externa mitocondrial.<sup>14</sup>

### 1.3.3. Estructura

Se trata de unas enzimas homodiméricas, esto quiere decir que la forma activa está compuesta por dos proteínas idénticas, lo que da como resultado un complejo voluminoso. Entre las diferentes isoformas, la estructura de cada monómero mantiene entre un 50 y un 60% de homología, estando especialmente conservado el lugar donde se produce la transformación del sustrato.<sup>15</sup>

Para su correcto funcionamiento, al igual que otras muchas enzimas, la NOS necesita de una serie de cofactores. Algunos de ellos ya han sido mencionados, como NADPH o el complejo CaCaM; los restantes serían el flavín adenín dinucleótido (FAD), el flavín mononucleótido (FMN), el grupo hemo y la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Más adelante se aclararán las funciones que cumple cada uno de ellos (Imagen 1).

La proteína que forma cada monómero está constituida por dos dominios de plegamiento independientes: un dominio oxigenasa en el extremo N-terminal y un dominio reductasa en el extremo C-terminal, entre ambos existe una región de reconocimiento CaCaM que los une.



**Imagen 1.** Estructura de iNOS simplificada (arriba)<sup>16</sup> y dimerizada (abajo).<sup>13</sup>

### 1.3.3.1. Dominio oxigenasa

En este dominio se encuentran los lugares de unión del grupo hemo, la  $\text{BH}_4$  y la L-Arg, siendo también el centro catalítico donde se produce la síntesis de NO.

Por regla general las enzimas redox basadas en el grupo hemo, como las de la familia del citocromo P450, poseen una estructura secundaria en la que predominan las hojas plegadas- $\beta$ . Sin embargo, el dominio oxigenasa de la NOS tiene una estructura particular, que da lugar a una conformación final descrita como “guante de béisbol”, donde una serie de  $\alpha$ -hélices se intercalan con pliegues  $\beta$  dejando el grupo hemo en el centro.

El átomo de Fe del grupo hemo se encuentra penta-coordinado y la coordinación extra se produce con Cys200 axial al plano, mientras que el resto del anillo porfirínico crea interacciones de Van der Waals con las cadenas alifáticas de los aminoácidos circundantes, e interacciones  $\pi$ - $\pi$  con Trp188 y Phe369 en iNOS. Este grupo, aunque no se une directamente a la L-Arg, es el que permite su oxidación al donar dos veces un par de electrones.

Una vez la enzima se encuentra dimerizada, aparece el centro activo en ambos monómeros de ella, este tiene forma de embudo de unos 30 Å de alto y 10 Å x 15 Å de sección transversal, espacio suficiente para la libre difusión de L-Arg y L-Cit. La L-Arg y el intermedio de reacción L-NOHA se unen con las cadenas laterales de los aminoácidos situados en la parte más estrecha de esta cavidad, con el resto guanidínico coplanar al grupo hemo.

El sitio de unión de  $\text{BH}_4$  se encuentra englobado por la proteína, cerca de la interfase de dimerización, aquí la interacción principal es el apilamiento del anillo aromático de indol en Trp463 y la pteridina de  $\text{BH}_4$ . Este cofactor participa en la cadena de transporte de electrones, siendo el encargado final de donar al grupo hemo un electrón. En este proceso pasaría a la forma  $\text{BH}_4^+$ , que revierte al estado original una vez acepta el electrón proveniente del dominio reductasa.

En el fondo de la interfaz del dímero existe un átomo de Zn en forma de tetratiolato, coordinado con dos cisteínas de cada subunidad: Cys100 y Cys115. Se comporta como un estabilizador del dímero y mantiene accesible el sitio de unión de  $\text{BH}_4$ , pero sorprendentemente no afecta a la actividad de la enzima.

### 1.3.3.2. Dominio reductasa

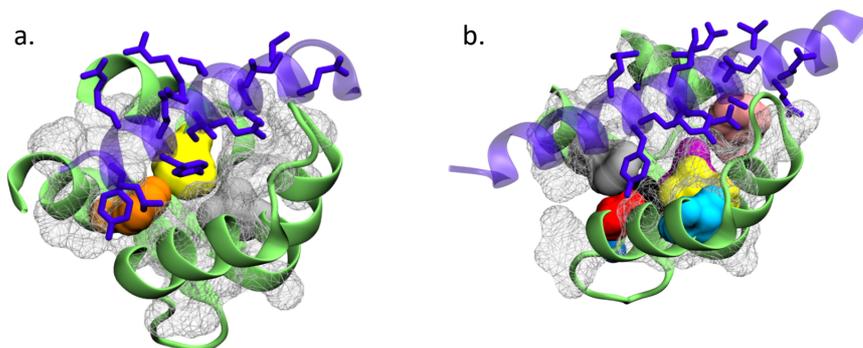
Este dominio, a diferencia del anterior, sí que presenta una alta homología con el de los citocromos P450, sirviendo como lugar de unión de los cofactores NADPH, FMN y FAD. La principal función que cumple es la de transportar los electrones donados por NADPH, a través de semiquinonas estables en las flavinas FAD y FMN, hasta el grupo hemo del dominio oxigenasa. En las isoformas constitutivas (nNOS y eNOS), específicamente en el sitio de unión de FMN, hay una secuencia de 50 aminoácidos en forma de lazo, capaz de regular la unión del complejo CaCaM a bajas concentraciones de calcio. La isoforma inducible, sin embargo, una vez se traduce el ARN mensajero, se une de forma irreversible a CaCaM.

Este dominio es capaz de mantener la función de transporte de electrones aunque no esté dimerizada la enzima, con la diferencia de que el aceptor final de dichos electrones es la molécula de  $O_2$  que pasa a  $O_2^-$ , en lugar del grupo hemo.<sup>17</sup>

### 1.3.3.3. Dominio de unión a calmodulina (CaM)

Esta región es la más pequeña de las tres, está formada por unos 25 aminoácidos cuya estructura secundaria es una  $\alpha$ -hélice de carácter básico y anfifílico.

A esta zona se une la calmodulina (Imagen 2), una proteína reguladora bilobular compuesta principalmente por  $\alpha$ -hélices y que, a la hora de unirse con el ion calcio, adquiere una conformación diferente que facilita su unión con la NOS.<sup>18</sup>



**Imagen 2.** Calmodulina libre (a) y unida a  $Ca^{2+}$  (b).<sup>18</sup>

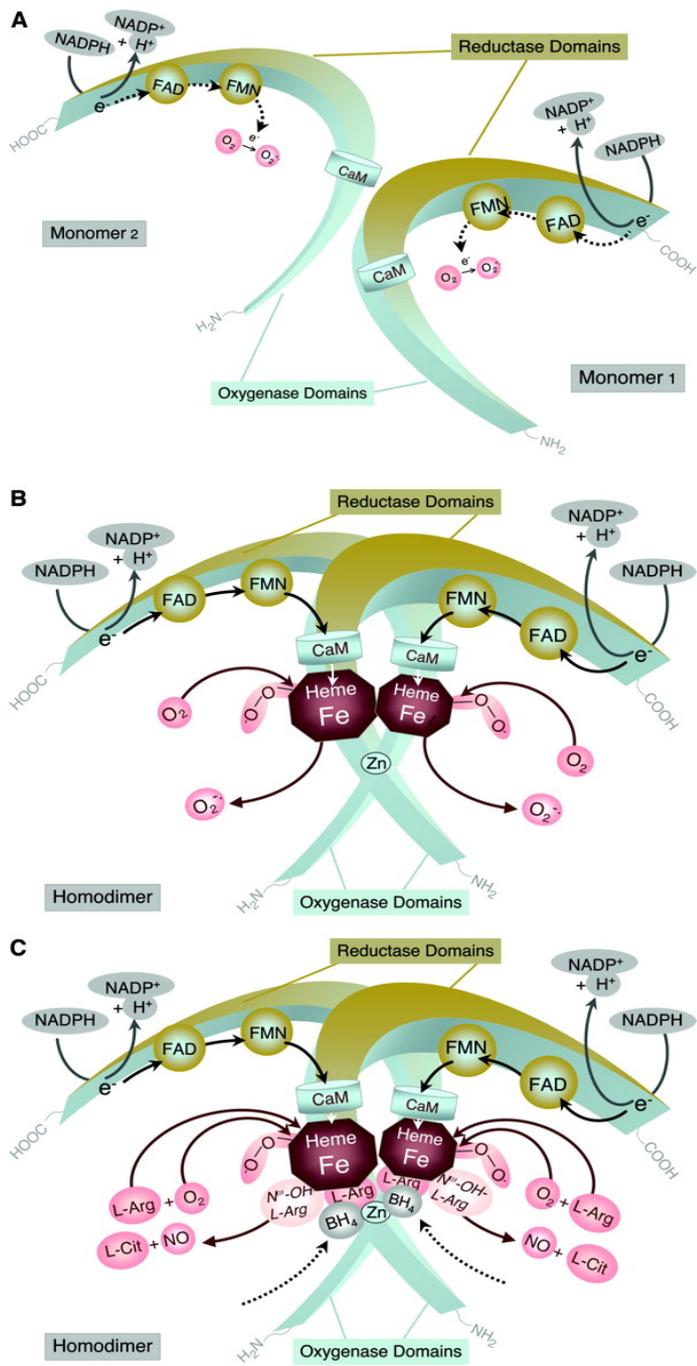
Una vez se une el complejo CaCaM, se facilita la dimerización de los dos monómeros y el flujo de electrones entre los otros dos dominios. En las isoformas constitutivas la secuencia clave de aminoácidos para la unión de este cofactor es: Phe, Ala, Val y Leu; mientras que en la isoforma inducible es Leu, Val, Val y Leu; esta última secuencia más hidrofóbica podría explicar la mayor afinidad que presenta iNOS por CaM.<sup>19</sup>

#### 1.3.4. Dimerización

Como mencionamos anteriormente, la asociación de las subunidades NOS para dar lugar a dímeros activos, requiere de las interacciones entre el comienzo y el final de los dominios oxigenasa de cada monómero. El espacio interfacial incluye el lugar de unión de BH<sub>4</sub> y ayuda a generar el bolsillo de unión de L-Arg (Imagen 3).

Para mantener las dos subunidades unidas juegan un papel clave las cisteínas Cys100 y Cys115, que se unen a sus homólogas del otro monómero por dos posibles vías: una unión directa por puentes disulfuro, o creando un ligando tetravalente con un ion Zn.

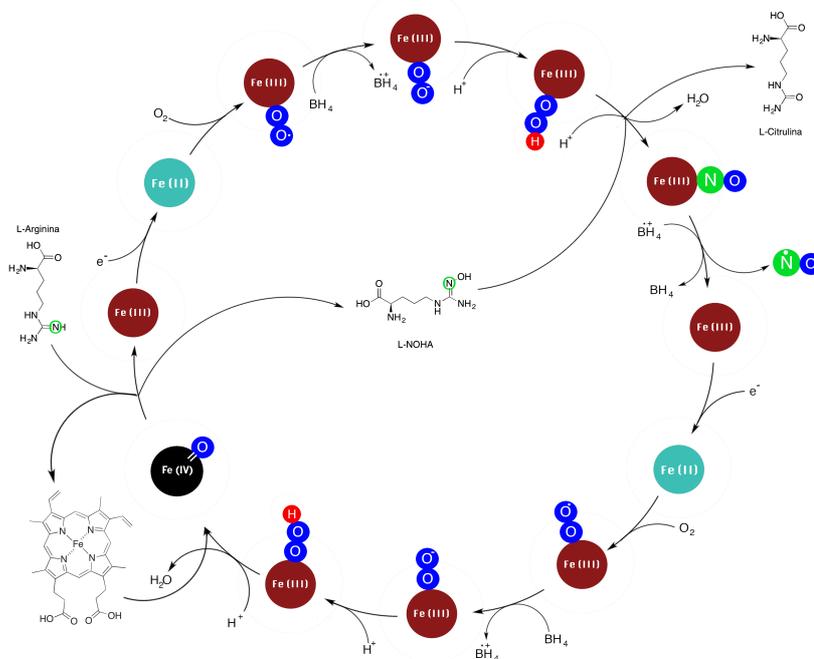
A pesar de que tanto la L-Arg como BH<sub>4</sub> facilitan la unión y mantienen la estabilidad de la forma activa, el único grupo indispensable es el hemo.<sup>15</sup>



**Imagen 3.** Esquema de dimerización de NOS.<sup>20</sup>

### 1.3.5. Ciclo catalítico del hierro

El ciclo propuesto (Fig. 2) comienza con el átomo de hierro del grupo hemo en el estado de reposo oxidativo Fe (III), un electrón transferido desde el dominio reductasa lo reduce a Fe (II), lo que permite la unión de una molécula de O<sub>2</sub> generando el radical Fe (III)-O-O·, sobre este actúa BH<sub>4</sub> donando un electrón y generando el anión Fe (III)-O-O<sup>-</sup>. La adición de un protón (posiblemente proveniente de L-Arg) da lugar al complejo Fe (III)-O-OH, y es entonces cuando el anillo de porfirina transfiere un protón y un electrón al oxígeno distal, liberando una molécula de H<sub>2</sub>O y quedando Fe (IV)=O. Es en este momento cuando la L-Arg reacciona para dar el intermedio L-NOHA y el hierro regresa a Fe (III). Para la segunda oxidación, se repiten los pasos que acabamos de mencionar hasta la formación del Fe (III)-O-OH, el cual es capaz de reaccionar de forma directa con L-NOHA para liberar L-Cit, dejando Fe (III)-NO. Finalmente, la BH<sub>4</sub> vuelve a intervenir para generar el NO. Mientras que la primera oxidación es común encontrarla en enzimas de la familia de las citocromo oxidasas, la segunda parte del ciclo solo es capaz de llevarla a cabo la NOS.<sup>19</sup>



**Figura 2.** Ciclo de oxidación del hierro.

## 1.4. Mecanismos de acción

Los efectos que genera el NO pueden dividirse en directos e indirectos.

Los efectos directos se caracterizan porque el propio NO se une al grupo hemo de las proteínas involucradas, siendo una respuesta directa y rápida. Los más destacados son:

- Activación de la guanilato ciclasa para producir cGMP.
- Unión con hemoglobina, mioglobina y citoglobina, que resulta en la descomposición del NO.
- Inhibición de citocromo oxidasa, reduciendo a su vez el consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial.
- Inhibición de catalasa, por lo que se disminuye la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

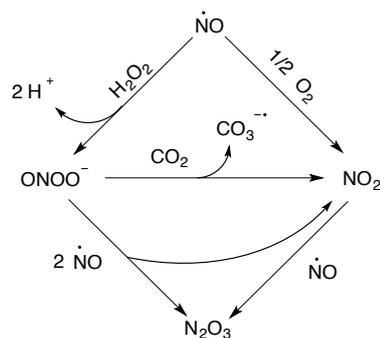
En los dos primeros casos el efecto tiene lugar a concentraciones fisiológicas, mientras que los dos últimos requieren concentraciones más altas.

En el caso de los efectos indirectos, el NO reacciona primero con otras moléculas y son los diferentes subproductos los que provocan las modificaciones en las células (Fig. 3).

Cuando la reacción es con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da lugar a peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), un anión altamente reactivo que puede aparecer en todo el rango de concentraciones, pero está controlado por la limitada cantidad de superóxido en el medio.

Al reaccionar con O<sub>2</sub> aparece dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), este proceso está sujeto a una cinética de orden 2, teniendo lugar a gran velocidad solo cuando la concentración de NO es alta; el NO<sub>2</sub> puede reaccionar a su vez con otra molécula de NO y dar lugar a óxido de nitrógeno (III) (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Este último producto también puede aparecer cuando ONOO<sup>-</sup> reacciona con dos moléculas de NO, generando a su vez NO<sub>2</sub>.

En presencia de CO<sub>2</sub>, el ONOO<sup>-</sup> produce NO<sub>2</sub> y CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, ambos fuertes oxidantes.



**Figura 3.** Reacciones del NO en el organismo.

Toda esta batería de compuestos altamente reactivos, capaces de nitrosar, nitrosilar y oxidar componentes celulares se denominan especies reactivas del nitrógeno (RNS), cuyos principales efectos a nivel metabólico consisten en la nitración de grupos tiol (SH), como en el glutatión o los restos de cisteína de las proteínas.<sup>8</sup>

A nivel mitocondrial se inhibe la respiración celular por dos vías principales: unión potente pero reversible de NO con citocromo oxidasa, y todas las reacciones irreversibles y no selectivas de las RNS con componentes mitocondriales claves. Como resultado de la disrupción de la cadena transportadora de electrones, se aumentan las concentraciones intracelulares de  $\text{O}_2$ , ROS, RNS y del propio NO, todo esto facilita la salida de superóxido y peróxido de hidrógeno de la mitocondria al citoplasma creando un círculo vicioso.

El conjunto de estas condiciones, unido a niveles altos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, puede desencadenar un aumento de la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria, liberando al citosol componentes que conllevan la muerte celular.<sup>21</sup>

#### 1.4.1. Necrosis y apoptosis derivadas de NO

En células no neuronales el óxido nítrico puede inducir la muerte celular por dos vías: necrosis y apoptosis.

La necrosis depende de la depleción energética provocada por múltiples factores:

- Inhibición de la producción de ATP por la disrupción de la cadena de transporte de electrones, como anteriormente mencionamos.
- Hidrólisis del resto de ATP celular por la activación y mantenimiento prolongado de la permeabilidad mitocondrial.
- Inhibición de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que inhibe la glicolisis en el citosol y activa las acetilaciones por ubiquitina en el núcleo.
- Activación de poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) como consecuencia de los daños en el ADN provocados por RONS, que consume  $\text{NAD}^+$  citosólico.

Como resultado, las bombas de calcio y sodio dejan de funcionar, aumentando la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  (desencadenando la activación de proteasas, fosfolipasas y dificultando la permeabilidad mitocondrial transitoria) y de  $\text{Na}^+$ , que termina desestabilizando el equilibrio osmótico de la célula y rompiendo la membrana plasmática.<sup>8</sup>

La apoptosis deriva del estrés oxidativo y nitrosativo que genera NO y RONS siguiendo varias vías:

- En el retículo endoplasmático aumenta la producción de proteínas chaperonas.
- Activación de la permeabilidad mitocondrial transitoria y la consecuente liberación de citocromo C, que, en presencia de suficiente ATP, activa las caspasas.
- Como consecuencia del daño al ADN, se acumula factor inducible de hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) e hiperfosforila el supresor tumoral p53, lo que aumenta la expresión del mediador de apoptosis regulado por p53 (PUMA) y libera citocromo C de la mitocondria.<sup>22</sup>
- A través de las proteínquinas activadas por mitógenos, concretamente p38, que aumenta la actividad de la tensina PTEN y disminuye la fosforilación de la quinasa AKT.<sup>23</sup>

#### 1.4.2. Citoprotección del NO

Paradójicamente, a pesar de todo lo descrito hasta ahora, el óxido nítrico es capaz de inhibir la apoptosis, principalmente cuando se encuentra en concentraciones bajas, por diversos mecanismos:

- Inhibición de la permeabilidad mitocondrial por la vía cGMP-proteínquina G.
- Activación de la vía fosfoinositol-3-quinasa/proteínquina B.

- Inactivación de caspasas por S-nitrosilación de la cisteína presente en su centro activo.
- Activación de la vía MAP quinasa.
- Activación de factores NF-kB y AP-1.
- Hiperpolarización mitocondrial.

Según Thomas et al.<sup>24</sup>, el NO activa diferentes rutas en función de su concentración:

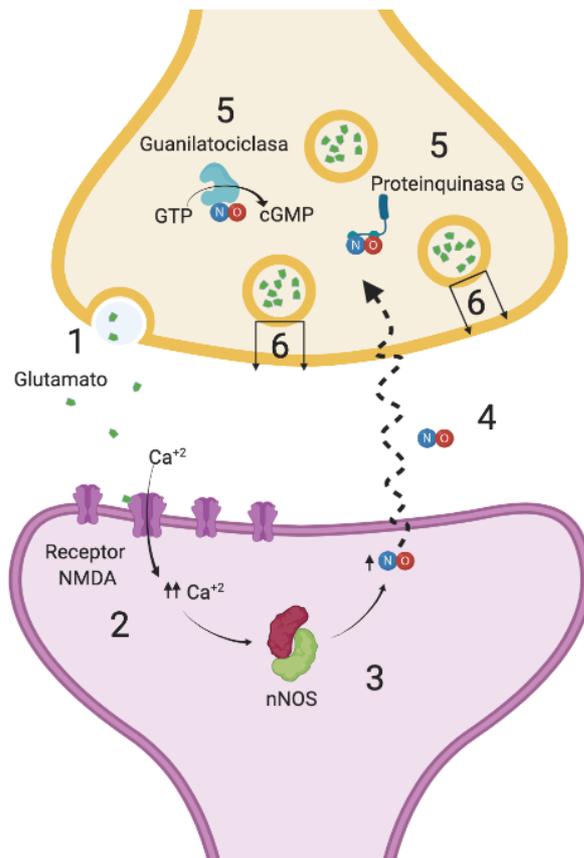
1. [NO] < 1-30 nM: activación de guanilato ciclasa.
2. [NO] = 30 - 100 nM: fosforilación de Akt.
3. [NO] = 100-300 nM: estabilización de HIF-1 $\alpha$ .
4. [NO] > 400 nM: fosforilación de p53.
5. [NO] > 1  $\mu$ M: producción de estrés nitrosativo.

Esto explica la dualidad de comportamiento citoprotector/proapoptótico-necrótico.

#### 1.4.3. El NO como neurotransmisor

El papel del NO en el cerebro está caracterizado por la posibilidad de comportarse tanto como neurotransmisor postsináptico, como presináptico retrógrado.

En la vía de la neurotransmisión glutamatérgica, (Imagen 4) una vez el Glu se une a su receptor en la neurona postsináptica, la concentración de Ca<sup>+2</sup> intracelular sube, lo que aumenta la producción de NO, este entonces puede difundir a través del espacio sináptico hasta llegar a la neurona presináptica, donde activa la ruta del cGMP y las proteinquinasas G, que fosforilan la sinaptofisina, proceso esencial para la fusión de los gránulos que contienen Glu con la membrana neuronal presináptica. Como se puede apreciar, esto da lugar a un feed-back positivo de neurotransmisión excitatoria.<sup>25</sup>



**Imagen 4.** Implicación del NO en la neurotransmisión glutamatérgica.

En la vía gabaérgica el NO se comporta como un inhibidor del SNC, a través de la cascada de señalización de cGMP, modula la actividad de los receptores NMDA, que aumentan la liberación de GABA en las neuronas corticales y estriatales.<sup>26</sup>

La capacidad de comportarse como un neurotransmisor excitatorio y como un potente vasodilatador, convierten al NO en una pieza clave del acoplamiento neurovascular, agrandando el diámetro de los vasos sanguíneos, como respuesta a la alta demanda metabólica de las neuronas activadas, y favoreciendo la liberación al espacio sináptico de más neurotransmisor, lo que permite mejorar la plasticidad neuronal.<sup>27</sup>

## 1.5. Regulación de la actividad

Como hemos podido comprobar, el NO se ve involucrado en una gran cantidad de procesos biológicos complejos, por lo que su regulación es clave para el correcto funcionamiento del organismo.

Debido a su alta promiscuidad por todo tipo de dianas y corto período de vida media, nuestro organismo solo es capaz de regular su actividad a nivel de la NOS.

En el caso de la isoforma inducible, al ser mucho más eficiente que las constitutivas, las regulaciones son principalmente a nivel de la expresión de la propia proteína, por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales.

A continuación, detallaremos las regulaciones que afectan principalmente a las isoformas constitutivas.

### 1.5.1. Feedback negativo

En primer lugar, debemos fijarnos en la propia regulación que ejerce el NO sobre la NOS.

Al poseer un grupo hemo involucrado en la catálisis del sustrato, la NOS es sensible a la alta estabilidad de los complejos ferroso-nitrosilo [Fe (II)-NO], que implican una considerable reducción de la eficiencia enzimática. Este freno en el ciclo oxidativo del hierro puede alcanzarse desde el estado basal de Fe (III), al ser atacado por NO<sup>-</sup> o por la reducción del intermedio Fe (III)-NO.

Para revertir este estado inactivo, el Fe (II)-NO debe reaccionar con O<sub>2</sub> volviendo al estado inicial de Fe (III), liberando como subproducto NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La cinética de esta reacción está relacionada con la isoforma en la que se produce, siendo mucho más rápido en iNOS que en las constitutivas. Esto podría deberse a la presencia de una serie de aminoácidos (sobre todo Trp y Tyr), capaces de generar enlaces de hidrógeno con ligandos del grupo hemo, que estabilizan el complejo nitrosilado.<sup>15</sup>

### 1.5.2. Calcio y CaM

La CaM, como ya mencionamos anteriormente, cumple un papel importante en la dimerización de la enzima, por lo que los niveles de

calcio, que permiten el cambio conformacional en esta proteína, influyen mucho en la actividad que presentan las isoformas constitutivas. Las isoformas neuronal y endotelial poseen una secuencia de 40 a 50 aminoácidos en el dominio reductasa, la cual ha sido descrita como un lazo auto-inhibitorio.<sup>28</sup>

### 1.5.3. Fosforilaciones

La actuación de proteínquinasas sobre las isoformas de la NOS puede dar resultados variados.

En eNOS, la fosforilación está relacionada con la regulación a largo plazo de la enzima. Es posible encontrar aminoácidos que al fosforilarse aumenten la actividad (Tyr81, Ser633 y Ser1177), dificultando la actuación del lazo auto-inhibitorio y permitiendo a la enzima trabajar a niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares mucho más bajos. Sin embargo, las fosforilaciones en Tyr657, Ser114 y Thr495 atenúan la actividad por efectos opuestos a las anteriores.<sup>11</sup>

Para nNOS, la fosforilación más importante es la de Ser847, que conduce a un descenso de la actividad de esta isoforma.

También es posible la fosforilación de CaM, que favorece la conformación en la que se une a las isoformas constitutivas de la NOS.<sup>28</sup>

### 1.5.4. Proteína inhibidora de NOS

La proteína inhibidora de la NOS (PIN), compuesta por 89 aminoácidos que se disponen como una cadena ligera de miosina y dineína, como su propio nombre indica, es capaz de inhibir a la isoforma neuronal de la NOS, impidiendo la dimerización de monómeros y favoreciendo la disociación de dímeros. El sitio de unión de este modulador se encuentra en el extremo N-terminal de cada monómero, y una sola PIN es capaz de unirse a dos subunidades NOS.<sup>29</sup>

### 1.5.5. Proteínas de shock térmico 70 y 90

Estas proteínas, conocidas como Hsp70 y Hsp90 por sus siglas en inglés, han sido identificadas como moduladores de la actividad de las isoformas neuronal e inducible. Ambas se unen al dominio oxigenasa de la NOS, pero provocan efectos contrapuestos.

En el caso de Hsp70, aumenta la ubiquitinación de la proteína favoreciendo la degradación de la misma, lo que disminuye la producción de NO; mientras que Hsp90, la cual se activa por el factor endotelial de crecimiento, la histamina o el estrés celular, reduce la ubiquitinación de la proteína y aumenta hasta tres veces la producción de NO.<sup>30, 31</sup>

#### 1.5.6. Kalirinina

La kalirinina es una proteína expresada preferentemente en neuronas, y es capaz de interactuar con los primeros 70 aminoácidos de iNOS para impedir su dimerización y promover su proteólisis. Esto le confiere un papel importante como neuroprotector en procesos inflamatorios del SNC.<sup>16</sup>

### 1.6. Trastornos neurodegenerativos

El término de trastorno neurodegenerativo engloba todas aquellas enfermedades que implican un deterioro progresivo e irreversible de la estructura y función neuronal.

Los mecanismos que pueden conducir a esta situación patológica son muy diversos: acumulación de proteínas anómalas en el espacio intracelular o extracelular, pérdida de excitabilidad neuronal, apoptosis y necrosis de neuronas.

A nivel sintomático aparecen pérdidas de memoria, desorientación, alteraciones psicológicas y déficits en la capacidad cognitiva y motora, más allá de lo que podría considerarse consecuencia del propio paso del tiempo.

Algunos ejemplos de estos procesos son las enfermedades de Alzheimer (EA), Parkinson (EP) y Huntington (EH), las parálisis cerebrales y los accidentes cerebrovasculares (ACV).

En este apartado se recopilan las posibles influencias que el NO pudiera tener en las principales patologías.

#### 1.6.1. Neuroinflamación

En primer lugar abordaremos un proceso común a la mayoría de enfermedades neurodegenerativas, y detectable incluso en la fase temprana de las mismas: la neuroinflamación.<sup>32</sup>

#### 1.6.1.1. Patología

La neuroinflamación es un proceso coordinado de respuesta celular frente a potenciales peligros y daños en el tejido cerebral. Se caracteriza por la liberación de sustancias pro-inflamatorias como citoquinas, proteasas y radicales libres.

Si tiene lugar de forma controlada, ayuda a la recuperación del tejido y mantiene el cerebro en condiciones saludables. Sin embargo, este mismo proceso, en ausencia de una regulación adecuada puede llegar a cronificarse, induciendo daños colaterales, disfunción neuronal y finalmente la muerte de las neurona afectadas.<sup>33</sup>

La reducida capacidad de regenerar compuestos antioxidantes y el gran número de reacciones capaces de producir sustancias oxidativas, convierten al cerebro en un órgano muy sensible al estrés oxidativo. La escasa capacidad de combatir a los agentes oxidantes se hace patente al comparar los bajos niveles de glutatión (GSH) en el cerebro frente al resto del organismo, y la moderada capacidad que las enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y GSH peroxidasa) presentan en este tejido. En el otro lado de la balanza, las reacciones capaces de generar estrés oxidativo se ven favorecidas por los altos niveles de ácido ascórbico, la alta concentración de metales de transición (Cu y Fe) y la enorme cantidad de metabolismo aeróbico que tiene lugar en el cerebro.

#### 1.6.1.2. Relación NO y neuroinflamación

En la gran mayoría de los factores que influyen en la neuroinflamación, el NO está implicado de forma directa o indirecta.

En primer lugar, la liberación de NO desde las células microgliales activadas provoca un bloqueo de la recaptación de glutamato, lo que aumenta su concentración en el espacio sináptico y activa los receptores NMDA, que, como mencionamos anteriormente, termina derivando en procesos de excitotoxicidad.

La sobreexpresión de iNOS que se produce también en células gliales activadas por NF- $\kappa$ B, conduce a un gran incremento de todos los derivados ROS y RNS, contribuyendo así a la neuroinflamación.<sup>34</sup>

## 1.6.2. Enfermedad de Alzheimer

La EA está reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una prioridad global para la salud pública.<sup>35</sup>

A pesar de que esta enfermedad se descubriera en 1907 por Alois Alzheimer, a día de hoy, su agente etiológico está todavía por determinar. Sin embargo, existen numerosos estudios acerca de las alteraciones fisiológicas, síntomas, evolución, epidemiología y factores que pueden influir en su aparición.

### 1.6.2.1. Patología

Los cambios fisiopatológicos más destacables en EA son el desarrollo de placas peptídicas  $\beta$ -amiloides en el exterior de las neuronas y la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares, derivados de la hiperfosforilación de la proteína tau.<sup>36</sup>

Las placas amiloides son acumulaciones extracelulares compuestas principalmente por dos tipos de proteínas plegadas de forma anómala:  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ , en función de si tienen 40 ó 42 aminoácidos. Ambas resultan ser subproductos del metabolismo de otras proteínas amiloides. Estas placas se caracterizan por formar fácilmente hebras que disminuyen drásticamente su solubilidad.<sup>35</sup>

Los ovillos neurofibrilares se forman a partir de un par de filamentos helicoidales resultantes de la hiperfosforilación de la proteína tau, sirviendo su acumulación intracelular para valorar la severidad de la EA.

Según la hipótesis amiloide, la más aceptada para el origen de la enfermedad, todo comienza con un problema en el metabolismo de las proteínas amiloides, que conlleva un desequilibrio entre la producción y la eliminación de  $A\beta_{42}$ . Estos oligómeros se van asociando formando fibras, y con el tiempo pasan a ser placas difusas que comienzan a reducir la eficacia de la transmisión sináptica. A continuación, una activación de la microglia y los astrocitos da lugar a una respuesta inflamatoria que genera daño oxidativo. La sinergia de la sinapsis mermada y el estrés oxidativo alterarían la actividad de las quinasas y fosfatasa para aumentar la fosforilación de la proteína Tau, generando los ovillos neurofibrilares. Esto conduciría finalmente a la muerte celular y, por tanto, a una pérdida masiva de neuronas y sinapsis que, a nivel macroscópico, se aprecia como atrofia de la materia blanca.<sup>35</sup>

La aparición de los primeros síntomas de EA podría comenzar hasta 20 años después de las primeras alteraciones neuronales que provoca la enfermedad, pasando completamente desapercibida para los pacientes.<sup>37</sup>

#### 1.6.2.2. Epidemiología

El estudio epidemiológico de esta enfermedad va ligado al de la demencia, debido a que, actualmente, la única forma definitiva de saber si un enfermo padece EA, es a través de un examen post-mortem de las lesiones en el cerebro.<sup>38</sup> Aun así, en torno al 60-70% de los casos de demencia están provocados por EA.

A nivel mundial alrededor de unos 50 millones de personas están afectados por la demencia, apareciendo 10 millones de casos nuevos cada año. Con el envejecimiento de la población y el aumento de la esperanza de vida previstas (sobre todo en los países en vías de desarrollo), se estima que la cifra de afectados por esta enfermedad alcance los 82 millones en 2030 y 152 millones en 2050.<sup>39</sup>

El impacto social y económico de este tipo de enfermedades que terminan siendo altamente incapacitantes es bastante elevado, al afectar también al entorno más cercano del enfermo. Sólo en el año 2015 supuso 818 mil millones de dólares en todo el mundo, igual al 1.1% del producto interior bruto global.<sup>39</sup>

Centrándonos en la población mayor de 65 años (el grueso de los afectados por EA), la media de la prevalencia a nivel mundial oscila entre el 5 y el 8%, en los países europeos es del 5.05%, pero al fijar el foco en el sur de Europa (España, Italia, Grecia) aumenta hasta el 6.88%.<sup>40</sup>

#### 1.6.2.3. Factores genéticos

Se estima que un 70% del riesgo de desarrollo de EA está ligado a factores genéticos<sup>35</sup>, no obstante, ninguno de los genes que se mencionarán a continuación es imprescindible ni suficiente para la aparición de la enfermedad. Cabe destacar también la alta variabilidad entre diferentes grupos étnicos, siendo los más estudiados los caucásicos.

Aunque a nivel clínico son indistinguibles, para los estudios a nivel genético se realiza una división entre los enfermos que presentan síntomas antes de los 65 años, o enfermedad temprana, y los que presentan una aparición tardía.

La aparición temprana supone menos del 9% del total de enfermos<sup>39</sup>, pero presentan una progresión mucho más acelerada y una transmisión hereditaria de tipo mendeliano autosómica dominante. Destacan tres genes (APP, PSEN1 y PSEN2) que codifican proteínas relacionadas con la formación de las placas  $\beta$ -amiloides y el metabolismo de las proteínas amiloides.

Sin embargo, en la aparición tardía de la enfermedad, los genes que se ven alterados con mayor prevalencia no se transmiten según las normas mendelianas: parientes de primer grado de pacientes con aparición tardía de EA pueden tardar en desarrollar la enfermedad el doble que otras personas. El primer gen descubierto con implicación en el riesgo de desarrollo de EA fue APOE (apolipoproteína E). Esta proteína puede estar codificada por dos copias de tres alelos distintos: APOE $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 y  $\epsilon$ 4. Poseer una copia de APOE $\epsilon$ 4 aumenta de dos a tres veces el riesgo de desarrollar EA, mientras que poseer las dos lo multiplica por cinco. Además, la presencia de cada una de las copias de APOE $\epsilon$ 4 en el genoma adelanta la aparición de los síntomas en 6-7 años. A lo largo de la primera década del siglo fueron apareciendo nuevos genes implicados en el riesgo de aparición de EA, se pueden englobar en tres rutas principales:

- Respuesta inmunitaria: CR1, CD33, MS4A4A, HLA-DRB5/DRB1.
- Procesado de los precursores de las proteínas amiloides: APP, BIN1, PICALM, CASS4.
- Metabolismo lipídico: CLU, SORL1, PKT2B.

#### 1.6.2.4. Factores no genéticos

En este grupo incluimos los factores ambientales relacionados con la EA y todas las patologías que puedan influenciar su aparición.

Al igual que los factores genéticos, se trata de un grupo muy diverso y heterogéneo en el que ninguna condición es suficiente o necesaria para que la EA comience.

Los accidentes cerebrovasculares favorecen la aparición de cualquier tipo de enfermedad relacionada con la demencia, al generar tanto un daño directo a la materia blanca del cerebro, como la hipoxia secundaria en la zona del tejido cerebral afectado.

La hipertensión durante las edades comprendidas entre los 40 y 60 años podría comprometer la integridad de la BHE, facilitando la penetración de proteínas y dañando las neuronas en última instancia.

Padecer diabetes tipo 2 aumenta hasta el doble el riesgo de desarrollar EA de aparición tardía. Esto es debido a que la enzima que se ocupa de degradar la insulina (IDE), es también la encargada a nivel cerebral de retirar el exceso de péptidos  $\beta$ -amiloides. Además, la insulina a nivel cerebral tiene el efecto directo de hiperfosforilar la proteína tau.

La relación entre el consumo de tabaco y la EA está sometida a una gran controversia, puesto que hay estudios que muestran que ejerce un efecto protector, defendiendo que la nicotina incrementa la respuesta de los receptores nicotínicos, reestableciendo así los déficits colinérgicos que aparecen en EA<sup>41</sup>; otros estudios, sin embargo, se basan en los efectos nocivos que ejercen el estrés oxidativo y la desregulación del sistema inmunitario<sup>42</sup> y, por último, también están aquellos que no aprecian relación alguna entre fumar y EA.<sup>43</sup>

En el caso del alcohol, numerosos estudios no consiguen establecer una relación clara con EA, al ser fácilmente confundible con la propia demencia derivada del alcoholismo.<sup>43, 44</sup>

Los traumatismos craneoencefálicos recurrentes han demostrado aumentar los casos de demencia, debido a una acumulación en el tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo de proteína tau, las proteínas amiloides y sus precursores.<sup>45</sup>

Un estilo de vida saludable está asociado con un efecto protector frente a EA. Este efecto se muestra en cualquier etapa de la vida, siempre que incluya ejercicio moderado, una dieta rica en pescados y verduras, no caer en índices de masa corporal extremos y se estimulen con frecuencia las actividades intelectuales.<sup>39</sup>

#### 1.6.2.5. El papel del NO en la EA<sup>46</sup>

A pesar de la complejidad de esta enfermedad, cada una de las 3 isoformas de la NOS se ha postulado como un factor importante en el avance o prevención de la EA.

Los efectos celulares del NO más importantes para esta patología son:

- Ser mensajero a través de la vía guanilatociclasa-cGMP.

- La formación de peroxinitritos.
- S-Nitrosilar residuos de cisteína en proteínas.
- Nitración de tiroxina en proteínas.

Qué ruta desencadena el NO depende de qué isoforma lo genera, el microambiente celular en el que se libera, incluyendo el estado redox, los metales de transición presentes, e incluso la localización dentro de la propia célula.<sup>47</sup>

A través de la vía de cGMP, el óxido nítrico se comporta como un neuroprotector, principalmente por la vasodilatación que provoca, incrementando el flujo de sangre que llega a las neuronas, reduciendo el estrés oxidativo que la propia molécula pueda generar, y disminuyendo el exceso de la respuesta a  $Ca^{+2}$  en sinapsis glutamérgicas a través de la inhibición de NMDA.

Unos niveles altos de NO dan lugar a que reaccione con el anión superóxido formado como subproducto en la respiración celular, dando lugar al anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un oxidante altamente reactivo y citotóxico que aumenta el estrés oxidativo de la célula.

Este anión es, a su vez, responsable de las otras dos rutas: S-nitrosilación de cisteína y nitración de tiroxina, ambos marcadores moleculares de la EA. Se teoriza incluso que  $ONOO^-$  sería capaz de interrumpir la vía de señalización de cGMP, pero debido a la corta vida media de las dos especies implicadas (< 3s para NO y < 1s para  $ONOO^-$ ) la determinación de las concentraciones *in situ* es muy complicada.

En el citosol de la neurona postsináptica, junto a los receptores NMDA, cuando se une el glutamato se produce un aumento de iones  $Ca^{+2}$ , esto desencadena la activación de la nNOS para producir NO, el cual se comporta como mensajero retrógrado que, en la neurona presináptica, provoca una despolarización de la membrana y libera más glutamato (feedback positivo).

En la EA, el problema aparece cuando el organismo trata de compensar la pérdida de receptores NMDA con mayores cantidades de NO para liberar más glutamato, aumentando la probabilidad de formarse  $ONOO^-$  y generar daño oxidativo.<sup>8</sup> Aún no se ha aclarado cómo el NO aumenta la excitabilidad de las neuronas presinápticas y media la liberación de más neurotransmisores en un sistema patológicamente saturado, pero se

teoriza con que están involucrados canales de transporte iónico, presumiblemente de potasio Kv7.<sup>46</sup>

La respuesta inmune e inflamatoria a la formación de las placas  $\beta$ -amiloides provoca que los niveles de iNOS estén aumentados en microglia y astrocitos, abriendo la posibilidad de que el NO forme ONOO<sup>-</sup>. De hecho, tanto la utilización de ratones transgénicos que no expresaban la iNOS, como el uso de inhibidores selectivos de iNOS en modelos de EA, mostraron menos efecto neurotóxico.

Otra de las conexiones entre NO y EA es la tendencia de presinilina-1 a formar más A $\beta$ -42 cuando aparece nitrotirosina en su estructura, de la misma forma que ocurre en EA de aparición temprana con las mutaciones en PSEN-1.

En un estudio del 2012, células SH-SY5Y capaces de expresar la proteína tau, fueron sometidas a altas concentraciones de NO. En ellas se consiguió aislar macroagregados de proteínas en los que no existía fosforilación alguna de la proteína tau. La estabilidad de estos conglomerados proteicos se debía a la formación de puentes disulfuro entre proteínas N-nitrosiladas. Estos macroagregados se comportarían como semillas de nucleación para formar ovillos neurofibrilares capaces de propagar la muerte neuronal, no solo en la célula que los produce, sino también en aquellas que los adquieren por endocitosis.<sup>48</sup>

### 1.6.3. Enfermedad de Parkinson

Entre los trastornos del movimiento, el Parkinson es el más común. Esta enfermedad fue descrita por James Parkinson en 1817, que, tras la observación de solo 6 pacientes, fue capaz de perfilar a grandes rasgos los síntomas y evolución de este desorden neuronal.

Al igual que en la EA, no existe una causa específica para el desarrollo de la EP, a pesar de ello, existe mucha información en relación al curso, desarrollo y factores que influyen en ella.

#### 1.6.3.1. Patología

Esta enfermedad, para la que a día de hoy no existe una cura, tiene un carácter crónico y degenerativo. Los principales síntomas que presenta se podrían resumir en:

- Tremor: temblor o agitación de las extremidades, la mandíbula y/o la cara. Se perciben mejor cuando el enfermo está en reposo y se mitigan cuando el movimiento es voluntario.
- Rigidez: los músculos, con el avance de la enfermedad, tienden a quedarse en el estado contraído.
- Bradiquinesia: movimientos excesivamente lentos.
- Problemas posturales y pérdida del equilibrio como consecuencia de todos los síntomas anteriores.

En fases más tardías de la enfermedad aparecen problemas en el habla, la deglución y el sueño.

Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por una pérdida masiva de neuronas dopaminérgicas en una región específica del cerebro: la parte compacta de la sustancia negra (pcSN). Las neuronas restantes presentan cuerpos de Lewy, aglomerados de proteínas nitrosiladas, fosforiladas y unidas a ubiquitina, que se encuentran envueltos por un halo de sinucleína- $\alpha$ , los cuales disminuyen la eficiencia de las neuronas. Aunque la presencia de estas alteraciones es el diagnóstico diferencial de la enfermedad, solo es posible observarlas en un examen postmortem.<sup>49</sup>

La deficiencia de dopamina resultante en los ganglios basales es la que provoca los síntomas motores. Es por ello que los tratamientos utilizados en esta enfermedad giran en torno a paliar el déficit dopaminérgico.

### 1.6.3.2. Epidemiología

En países industrializados la EP afecta al 0.3% de la población, este porcentaje se eleva hasta el 1% en los mayores de 60 años y tiene una prevalencia mucho mayor en hombres que en mujeres.

Con los datos del año 2015, cuando el número de enfermos estaba alrededor de 6.9 millones, se realizó un estudio de la proyección de la enfermedad en los siguientes 25 años. Su resultado arrojó unas cifras poco prometedoras, ya que en 2040 el número de afectados se duplicará hasta los 14.2 millones a nivel mundial.<sup>50</sup> En España, con los datos del año 2005, se estimó que pasaríamos de 0.26 a 0.40 millones en 2030.<sup>51</sup>

El aumento de la esperanza de vida, junto con los avances terapéuticos y diagnósticos para la EP, son los responsables, tanto de las estimaciones anteriores, como de que la tasa de crecimiento para esta enfermedad actualmente esté por encima de la del Alzheimer.<sup>52</sup>

### 1.6.3.3. Factores de riesgo

El riesgo de desarrollar EP depende de un amplio abanico de factores genéticos y ambientales.<sup>49</sup>

Entre los genéticos destacan las mutaciones en SNCA, que codifica la sinucleína- $\alpha$ , las mutaciones en LRRK2 y parkin, que son las más comunes en los casos de EP heredada de forma dominante y recesiva, respectivamente, y, por último, las mutaciones en GBA, gen que expresa  $\beta$ -glucocerebrosidasa. Mutaciones en este último gen suponen el mayor factor de riesgo para la EP.

En el caso de los factores ambientales, la exposición a pesticidas, los traumatismos encefálicos, el uso de  $\beta$ -bloqueantes y vivir en entornos rurales aumentan las probabilidades de desarrollar EP, mientras que el consumo de tabaco, café y alcohol, paradójicamente, las reducen.

### 1.6.3.4. El papel del NO en EP

Partiendo del modelo de evolución de la enfermedad, pueden obtenerse evidencias de que existe una respuesta inflamatoria crónica en las neuronas dopaminérgicas de la pcSN. Esta situación podría desencadenarse debido a la activación de la microglia y astroglia, involucrando al NO. A continuación enumeraremos algunos de los motivos que sustentan esta teoría.

En modelos de la enfermedad inducidos por LPS o 6-hidroxidopamina en la pcSN, se ven favorecidas la vía apoptótica mitocondrial del NO y la sobreexpresión de iNOS.<sup>53</sup>

En los leucocitos polimorfonucleares que aparecen en pacientes de EP, se ha detectado una sobreexpresión de nNOS y un incremento de la concentración de peroxinitritos.<sup>54</sup>

La formación de los agregados de sinucleína- $\alpha$  está relacionada directamente con la concentración de peroxinitritos y otros ROS, su presencia en las neuronas dopaminérgicas contribuye a la depleción de ATP, activación microglial y aumento de la muerte celular.<sup>55</sup>

En el examen post mortem de cerebros de pacientes con EP fueron detectadas citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6 ) relacionadas con NO.<sup>56</sup>

La proteína parkin, la cual ejerce una función protectora en el cerebro al reprimir la transcripción de p53, en concentraciones patológicas de NO, sufre de S-nitrosilaciones, lo que se traduce en una mayor adición de ubiquitina a su estructura e interferencias con su normal funcionamiento.<sup>57</sup>

### 1.7. Otras patologías

Más allá de las enfermedades que provoca a nivel del SNC, las características como segundo mensajero del NO, unido a la ubicuidad de vasos sanguíneos dentro de nuestro cuerpo, y la capacidad de cualquier célula del organismo para expresar iNOS, convierten al óxido nítrico en un potencial responsable de diversos desequilibrios metabólicos.

El papel clave que juega el NO en la regulación de la constricción vascular, hace que, la regulación de eNOS sea un punto susceptible de alteraciones en tensión arterial, gasto cardíaco, irrigación de tejidos y agregación plaquetaria. En consecuencia, la sobreexpresión de eNOS en el endotelio vascular desencadena estrés oxidativo, que favorece el avance de la arteroesclerosis, inflamación de tejidos anexos y disfunción endotelial.<sup>58</sup> Por el contrario, la inhibición de esta isoforma, impide la relajación del tejido muscular liso en los vasos sanguíneos, que inevitablemente provoca un aumento de la tensión arterial.<sup>59</sup> Este fenómeno puede observarse especialmente como efecto secundario en tratamientos experimentales con inhibidores de la NOS.

El NO que produce la iNOS está estrechamente ligado con la respuesta inmunitaria. Sus cualidades citotóxicas, pro-inflamatorias y moduladoras de la respuesta inmunitaria adaptativa, lo involucran frecuentemente en patologías derivadas de fallos en el sistema inmunitario.<sup>60</sup> Algunos ejemplos serían asma, artritis, colitis, desarrollo de tumores, rechazo de trasplantes o shock séptico.<sup>61</sup>

### 1.8. Antecedentes químicos

La implicación de la NOS en todos los procesos neurodegenerativos anteriormente mencionados abrió todo un nuevo campo para luchar contra este tipo de enfermedades.

El desarrollo de inhibidores potentes y selectivos de las isoformas neuronal e inducible dio lugar a una amplia variedad de compuestos con mecanismos de acción muy diferentes entre sí.

Siguiendo la clasificación propuesta por Mukherjee et al.<sup>62</sup> y Minhas et al.<sup>63</sup>, se distinguen las siguientes familias de inhibidores:

### 1.8.1. Inhibidores competitivos del sustrato

#### 1.8.1.1. Inhibidores análogos de L-arginina

Los análogos de la L-Arg fueron los primeros en desarrollarse, su mecanismo de acción se basa simplemente en competir directamente por el sitio de unión a la enzima, bien sea en su fase inicial o en el intermedio oxidado L-NOHA (ver Fig. 1, pag. 4).

Las primeras aproximaciones a inhibidores de la NOS fueron modificaciones de la estructura de la propia L-Arg.

La *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginina o L-NA **1**<sup>64</sup> (Fig. 4) tiene una  $K_i \cong 15$  nM sobre nNOS bovina<sup>65</sup>, no se metaboliza demasiado rápido y es capaz de atravesar la BHE rápidamente. El derivado con metil éster, también conocido como L-NAME **2**<sup>64</sup>, es más potente, posiblemente por una mejor biodisponibilidad. El problema que tienen ambas es la falta de selectividad, conduciendo a una inhibición no deseada de eNOS, lo que conllevaría casos de hipertensión si se administrase a nivel sistémico<sup>66</sup>.

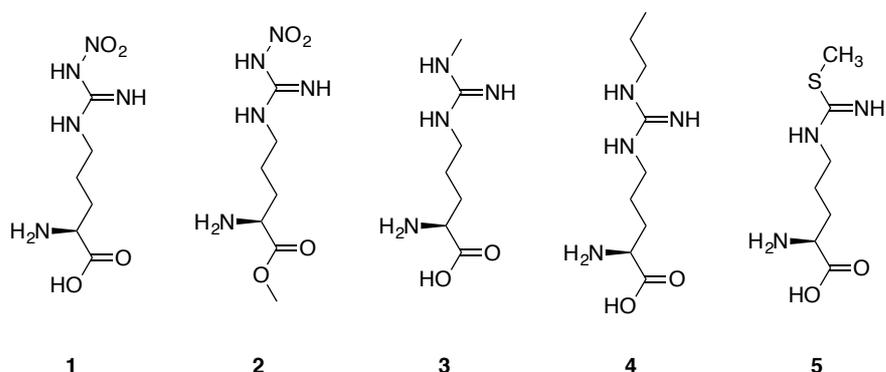


Figura 4. Análogos de L-Arg.

A diferencia de otras modificaciones en la estructura, la alquilación del resto guanidínico mantiene la actividad inhibitoria. La *N*<sup>ω</sup>-metil-L-arginina o L-NMA **3**<sup>67</sup>, tiene la capacidad de acumularse en el tejido cerebral de

ratas<sup>68</sup> y mitigar migrañas en ensayos clínicos con humanos<sup>69</sup>. Sin embargo, mantiene el efecto adverso de la hipertensión. Al aumentar la longitud de la cadena, como en la *N*<sup>ω</sup>-propil-L-arginina **4**<sup>70</sup>, la selectividad frente a iNOS mejora considerablemente y de forma más sutil frente a eNOS.

Al sustituir uno de los nitrógenos por azufre aparece la familia de las tiocitruínas, las cuales son más selectivas frente a eNOS pero apenas difiere su potencia entre iNOS y nNOS, destaca entre ellas la S-metil tiocitruína o L-MIT **5**<sup>71</sup>. Sin embargo, las características físico-químicas asociadas a estas estructuras, tales como basicidad, polaridad y capacidad para generar enlaces de hidrógeno, reducen su capacidad de atravesar membranas celulares, especialmente la BHE, al no poseer ningún mecanismo de transporte activo<sup>72</sup>.

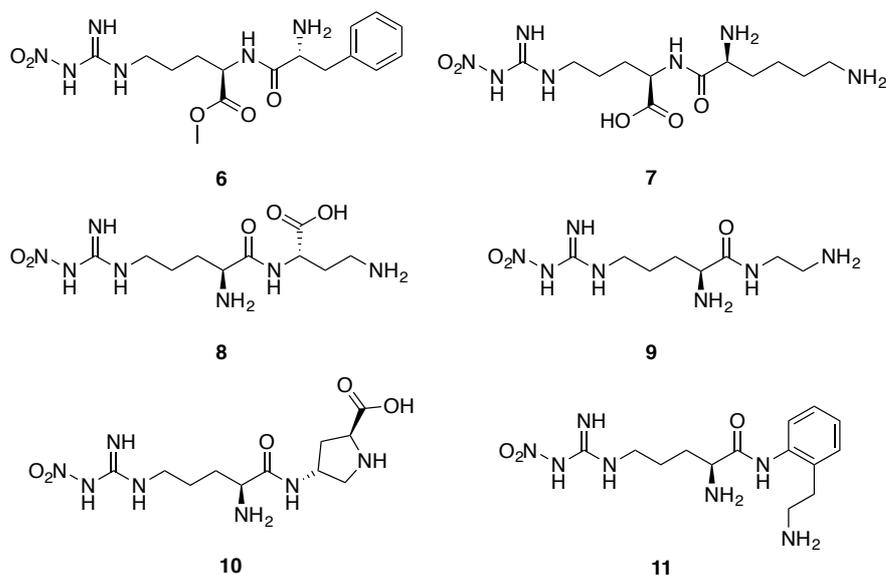
#### 1.8.1.2. Inhibidores basados en dipéptidos o peptidomiméticos

Esta familia de inhibidores tiene como característica común basarse en un análogo de la L-arginina para desarrollar estructuras de mayor tamaño a partir de ellas.

Los dipéptidos derivados de la isotiocitruína con sustituyentes hidrofóbicos y voluminosos resultaron tener preferencia a la hora de inhibir la iNOS, mientras que aquellos con sustituyentes más pequeños inhibían mejor la nNOS<sup>73</sup>, dando una primera idea de las diferencias en el tamaño del bolsillo para el sustrato en cada una de las isoformas.

Partiendo de los nitroderivados de la arginina L-NA y L-NAME, se desarrollaron dipéptidos como D-Phe-D-Arg-NO<sub>2</sub>-OMe **6**<sup>74</sup>, el cual inhibe nNOS con *K*<sub>i</sub> de 2 μM y es ~1800 veces más selectivo sobre nNOS que iNOS (Fig. 5). De entre todos los dipéptidos sintetizados, aquellos que combinaban aminoácidos con grupos nitrogenados básicos (L-Lys y L-His) resultaron ser potentes inhibidores nNOS, *K*<sub>i</sub> = 1,7 μM para **7** y *K*<sub>i</sub> = 0,13 μM para **8**. A esto se añadía el hecho de que acortar las cadenas laterales en uno o varios carbonos aumentaba la selectividad de nNOS frente a otras isoformas, obteniendo así valores de 2765 nNOS/iNOS para **7** y 1538 nNOS/eNOS para **8**<sup>75</sup>. A pesar de ello, estas moléculas están sometidas a muchas limitaciones para su administración sistémica: el gran número de grupos ionizables puede hacer aparecer múltiples cargas, el enlace peptídico presente en estas moléculas es bastante lábil y además todas ellas presentan una baja biodisponibilidad oral<sup>76</sup>.

Para mejorar estas deficiencias se desarrollaron los derivados **9**, **10** y **11**, los cuales restringen el número de conformaciones que estos inhibidores pueden adoptar, refuerzan los enlaces entre aminoácidos mediante la reducción de las amidas<sup>77</sup>, e introducen grupos lipofílicos para mejorar el paso a través de las membranas celulares. Otra característica que se implementó fue la introducción de un grupo hidroxilo terminal en lugar de una amina, aumentando la potencia inhibitoria en un orden de magnitud. Esto hacía vislumbrar la importancia de las interacciones electrostáticas sobre enlaces de hidrógeno en el centro activo de la enzima. Posteriores ensayos cristalográficos<sup>78</sup> demostraron que esta modificación establecía un enlace aniónico con Asp597 en nNOS de rata (Asp602 en humanos), mientras el resto nitroguanidínico interactuaba con Glu592 (Glu597 en humanos). En eNOS el lugar Asp597 está ocupado por Asn368, lo que explicaría la alta selectividad por la isoforma neuronal.



**Figura 5.** Derivados peptidomiméticos.

El compuesto **11** fue sometido a un test para evaluar su eficacia frente a la parálisis cerebral, el modelo de estudio se llevó a cabo en fetos de conejos, donde se inducía un daño por hipoxia en el útero de la madre<sup>79</sup>. Este dipéptido, derivado de *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina, con un anillo aromático y el enlace amidínico reducido, protegió el cerebro de los fetos de rata y disminuyó el número de muertes de manera dosis-dependiente, cuando se administró vía intrauterina<sup>80</sup>.

### 1.8.1.3. Inhibidores basados en modelos computacionales

Una vez estuvieron disponibles las estructuras cristalinas de las tres isoenzimas de la NOS, el estudio del farmacóforo fue posible a través de los métodos de “anclaje plástico”<sup>81</sup>, “encaje inducido” y “campos de interacción molecular” (MIF).<sup>82</sup>

Estas aproximaciones computacionales permitieron determinar las partes de la molécula claves para ofrecer una máxima potencia inhibitoria y buena selectividad entre isoformas.

Los MIF comprueban todo tipo de interacciones: estéricas, hidrofóbicas, electrostáticas y enlaces de hidrógeno (tanto grupos dadores como aceptores), en todo el entorno del centro activo de la enzima. Para la nNOS las interacciones predominantes resultaron ser las hidrofóbicas y las electrostáticas.

A partir de inhibidores conocidos de la nNOS como las 2-aminopiridinas<sup>83</sup>, las quinazolininas<sup>84</sup> y los derivados dipeptídicos<sup>73</sup>, unidos a programas de intercambio de fragmentos como GRID o MCSS, se llegó a la mínima expresión del farmacóforo para las relaciones de estructura-actividad (REA).

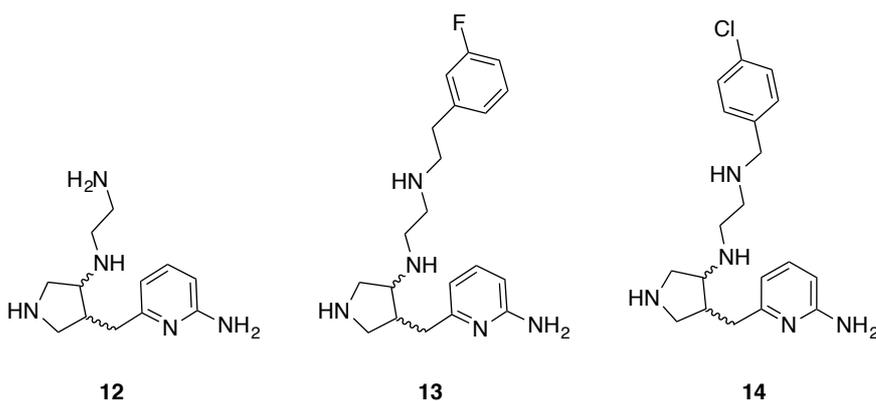


Figura 6. Derivados de 2-aminopiridina.

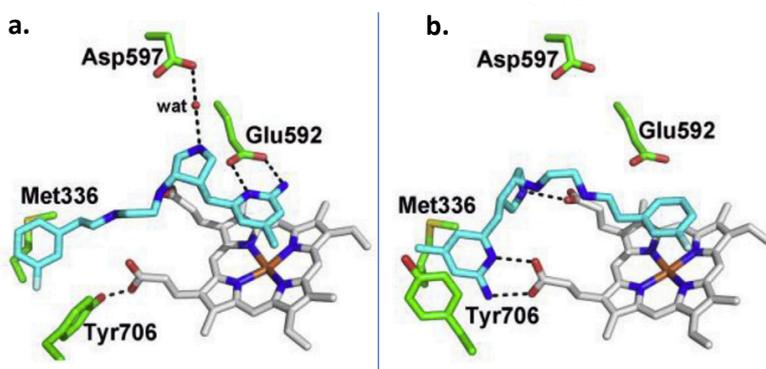
La familia de las pirrolidinometil-2-aminopiridinas fue el resultado de los estudios computacionales anteriormente mencionados. El compuesto **12**<sup>85</sup> mostró  $K_i = 388$  nM sobre nNOS, 1000 veces más selectivo nNOS/eNOS y 150 nNOS/iNOS. A partir de este, se buscó mejorar la lipofilia para conseguir moléculas con mejores características

farmacocinéticas, como enmascarar la amina secundaria con grupos arilalquilo, apareciendo así los compuestos **13** y **14** (Fig. 6).

En este punto comienza a cobrar importancia la estereoquímica, puesto que los diferentes isómeros adoptan conformaciones distintas dentro de la enzima.

En la unión “normal”, el resto de aminopiridina interacciona con el glutamato presente en el centro activo Glu592, mientras la cola aromática queda orientada hacia un bolsillo lipofílico, formado por Leu337, Met336 y Tyr706 (Imagen 5a).

En cambio, en la disposición invertida, la aminopiridina va al bolsillo hidrofóbico para formar un puente iónico con un propionato del grupo hemo y el anillo arílico se coloca en paralelo sobre el grupo hemo, esto se debe también a que el residuo de Tyr706 gira para favorecer el apilamiento  $\pi$  cuando el inhibidor está presente (Imagen 5b).



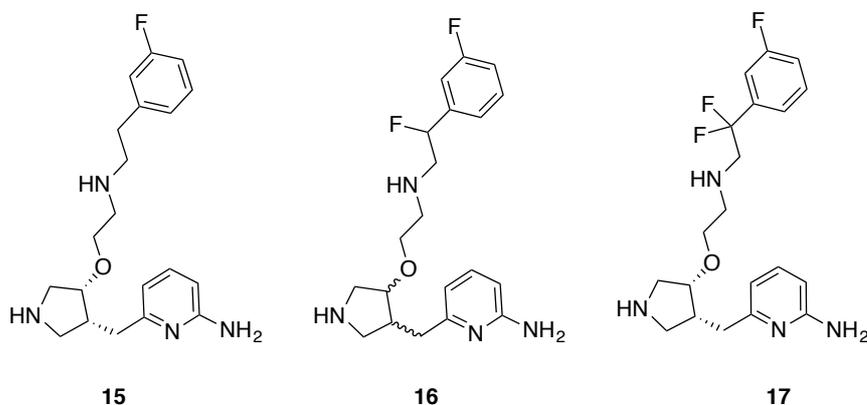
**Imagen 5.** Conformaciones normal (a) e invertida (b) de los diferentes isómeros de **13**.<sup>86</sup>

Los compuestos **13** y **14** también se ensayaron en el modelo neurodegenerativo de isquemia inducida en fetos de rata, en este caso fueron administrados por vía intravenosa; ambos mostraron prometedores signos de neuroprotección, tanto en la disminución de defectos motores, como en la ausencia de mortalidad (en el grupo control ronda el 50%)<sup>79</sup>.

A pesar de unos resultados tan prometedores, todos estos compuestos sufren de los mismos inconvenientes que sus predecesores, como el poseer varios grupos ionizables, la gran cantidad de enlaces de H que

pueden formar, la flexibilidad de las cadenas laterales y su alta tPSA (área de superficie polar total). Las consecuencias son claras: una baja biodisponibilidad oral y dificultad a la hora de atravesar la BHE<sup>87</sup>.

Al reemplazar en los anteriores derivados la amina secundaria exocíclica por un oxígeno, se obtuvo uno de los inhibidores de nNOS más potentes conocidos hasta la fecha: el compuesto **15**<sup>88</sup>, concretamente el enantiómero (R,R), que tiene  $K_i = 7$  nM y selectividad notable, 2667 nNOS/eNOS y 806 nNOS/iNOS. Como todavía se mantenían los problemas de biodisponibilidad, se decidió fluorar posiciones de la cadena lateral, apareciendo **16**<sup>85</sup>, donde se mejoró el paso a través de membranas celulares, y **17** (Fig. 7), compuesto cuya vida media en ratas era superior y la biodisponibilidad alcanzaba el 22% en el enantiómero (R,R)<sup>89</sup>. En ambos casos se vieron afectadas ligeramente la potencia y la selectividad.



**Figura 7.** Derivados avanzados de aminopiridinas.

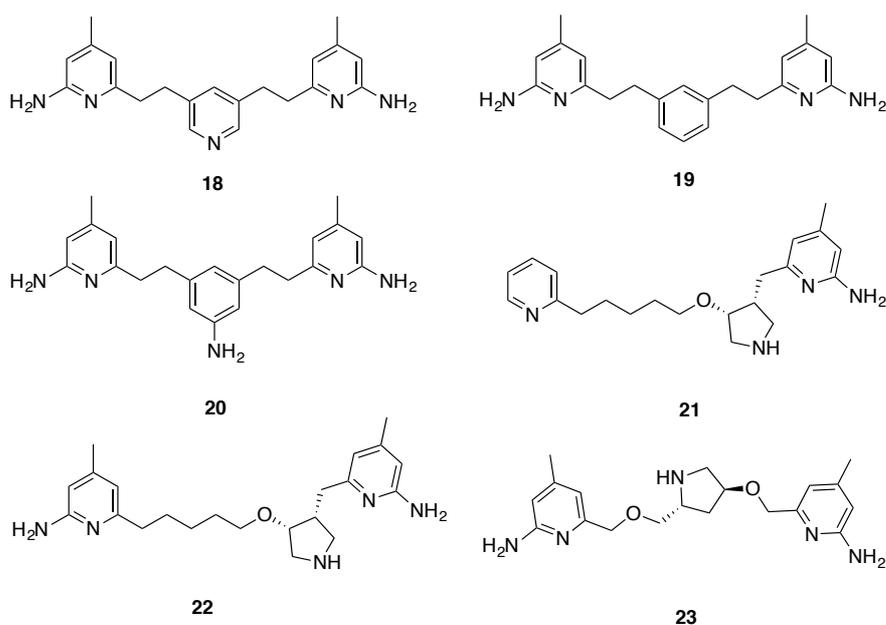
Estas estructuras requieren de una síntesis con un gran número de pasos, en ciertos casos complejos, a los que después hay que sumar la separación de los diastereoisómeros que generan todos los centros quirales que poseen. A la hora de simplificar estos compuestos, los modelos computacionales muestran que incluso pequeñas modificaciones isostéricas pueden afectar en gran medida a la actividad inhibitoria<sup>90</sup>.

#### 1.8.1.4. Inhibidores diméricos de aminopiridina

Los inhibidores que acaban de ser expuestos pueden adaptar dos configuraciones, en ambas el resto de aminopiridina juega un papel crucial. En la configuración normal emulan la fracción guanidínica de la L-Arg creando un puente iónico con Glu592, mientras que en la

configuración invertida encajan en el bolsillo periférico formado por Tyr706, Leu337 y Met336.

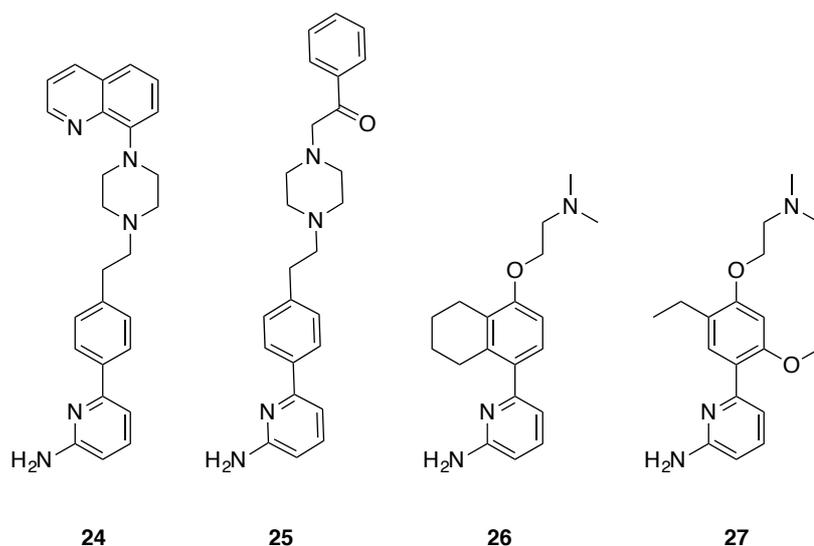
A partir de esta información, el grupo de Xue et al.<sup>91</sup> desarrolló una serie de compuestos que combinaban dos restos de aminopiridina, ambos unidos por un espaciador que daba lugar a compuestos simétricos, capaces de interactuar con la enzima en los dos puntos antes mencionados. Destacan **18**, **19** y **20** (Fig. 8) como los más representativos, siendo **18** el más potente, con  $K_i = 25$  nM, pero con limitada selectividad, 107 nNOS/eNOS y 58 nNOS/iNOS.



**Figura 8.** Derivados diméricos de aminopiridinas.

Para mejorar la selectividad se sintetizaron **21** y **22**<sup>90</sup> (Fig. 8), estos conectan los anillos de piridina con análogos de los anteriores inhibidores. El más potente es **22**, con una  $K_i = 38$  nM y 1117 veces más selectivo nNOS/eNOS y 619 nNOS/iNOS. En el caso de **21** la potencia es algo menor ( $K_i = 74$  nM), pero es más selectivo frente a eNOS (2012 nNOS/eNOS y 132 nNOS/iNOS).

Al optimizar el modelo con anillo de pirrolidina, los intentos de eliminar centros estereogénicos conllevaron pérdidas de potencia y selectividad, sin embargo se consiguió alcanzar **23**, con  $K_i = 9.7$  nM para nNOS, 693 veces más afín que por eNOS y 295 veces que por iNOS<sup>92</sup>.



**Figura 9.** Inhibidores desarrollados por Pfizer.

La farmacéutica Pfizer, utilizando aminopiridina como fragmento clave, se ha centrado en estructuras simples, generadas a través de bibliotecas de compuestos<sup>93</sup>. Un ejemplo es **24** (Fig. 9), que pese a tener una potencia considerable ( $IC_{50} = 127$  nM en nNOS de rata y 140 nM en nNOS humana), se trata de un inhibidor bastante promiscuo, afectando también a receptores de dopamina y serotonina.

La introducción de un grupo con hibridación  $sp^2$  en el extremo distal del anillo de piperazina disminuye estos efectos negativos y mejora discretamente la selectividad nNOS/eNOS (hasta 6 veces), resultando el derivado **25**.

En 2004 se mejoró la deficiencia de selectividad acortando el anillo de piperazina a dimetilamina y haciendo más voluminoso el anillo aromático intermedio, como se puede apreciar en **26**, que presenta un ciclo de 6 miembros condensado<sup>94</sup>, y **27** con los restos de etilo y metoxilo<sup>95</sup>; este último compuesto es el mejor de la serie, con  $IC_{50} = 75$  nM y una selectividad de 220 veces frente a eNOS. No obstante, los ensayos *in vivo* mostraron un perfil farmacocinético pobre, que conllevó el cese del desarrollo de esta familia (Fig. 9).

#### 1.8.1.5. Inhibidores tienoamidínicos o tienocarboximidamídicos

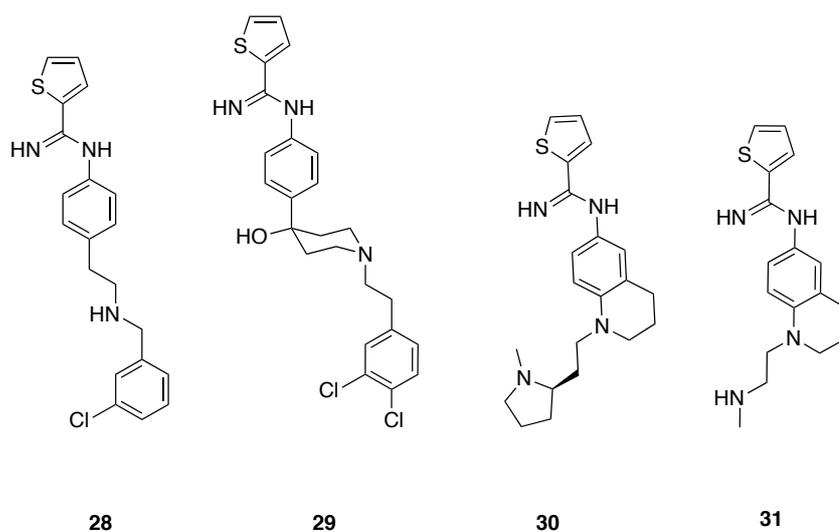
AstraZeneca introduce en sus inhibidores de la NOS un anillo de tiofeno como bioisómero de la piridina, manteniendo habitualmente un núcleo

acetamidínico. Aparece así como cabeza de serie **28**<sup>96</sup>, un potente inhibidor nNOS ( $IC_{50} = 35 \text{ nM}$ ) con cierta selectividad frente a las otras isoformas (143 veces frente a iNOS y 100 frente a eNOS) (Fig. 10).

Los ensayos en animales revelaron varias características interesantes de este compuesto:

- Una elevada vida media, que permite mantener hasta 24 horas después de su administración una inhibición en nNOS del 50% a nivel del cerebelo (determinación *ex vivo*).
- Reduce un 55% el riesgo de infarto en una semana después de un accidente cerebrovascular (modelo de isquemia focal en ratas)<sup>97</sup>.
- Disminuye significativamente la muerte neuronal durante las 72 horas posteriores a una isquemia en perros inducida por arresto circulatorio hipotérmico<sup>98</sup>.

Al estudiarse cristalográficamente<sup>99</sup>, las interacciones principales con la enzima se deben a que el fragmento de tienoamidina mimetiza a la arginina al unirse con Glu592, mientras la amina secundaria forma un puente de hidrógeno con el grupo hemopropionato, por último la cadena espaciadora orienta el clorofenilo hacia el canal hidrofóbico constituido por Tyr706, Leu337 y Met336, a través del cual el sustrato accede al centro activo de la enzima.

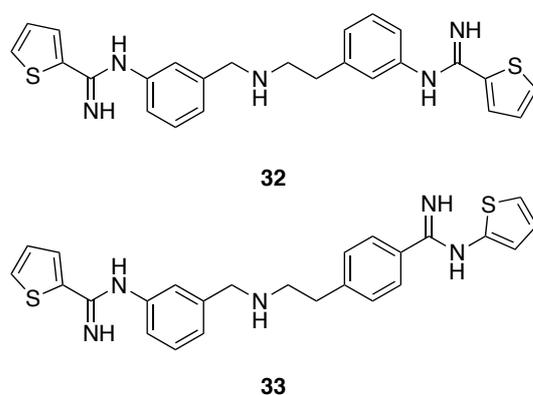


**Figura 10.** Derivados tienoamídnicos.

Sanofi-Aventis contribuye también a esta familia de compuestos con **29**, en este derivado se incluye un anillo de piperidina con una cadena terminal diclorofenetílica. Sus estudios de docking muestran que es capaz de alcanzar el bolsillo hidrofóbico exclusivo de nNOS, lo que le otorga a este inhibidor una  $IC_{50} = 17$  nM frente a nNOS y buena selectividad respecto a eNOS (1664 veces). Los ensayos *in vitro* sobre microsomas hepáticos humanos dieron como resultado una estabilidad metabólica baja, con una bioconversión del 32% tras 20 min<sup>100</sup>.

NeurAxon desarrolló posteriormente, a partir de la base de tienoamidina, inhibidores con una porción central rígida (formada por anillos fusionados) y una corta cadena terminal que incluye una amina. Un buen ejemplo es **30**<sup>101</sup> (Fig. 10), que presenta potencia *in vitro* ( $IC_{50} = 98$  nM), eficacia *in vivo* (en modelo de dolor neuropático en ratas), cierta selectividad frente a otras isoformas (110 veces nNOS/eNOS y 255 veces nNOS/iNOS) y no interfiere la labor de los principales citocromos. A pesar de ello, presenta una baja biodisponibilidad oral (18%) y cierta inhibición de canales de potasio hERG ( $IC_{50} = 4.7$   $\mu$ M)<sup>102</sup>, lo que podría conllevar arritmias en el caso de administrarse en humanos<sup>103</sup>.

Se fueron introduciendo modificaciones hasta alcanzar **31**<sup>102</sup>, el cual mantiene una potencia inhibitoria similar a su predecesor ( $IC_{50} = 176$  nM) y su perfil seguro frente a los citocromos, pero mejora la selectividad (231 veces nNOS/eNOS y más de 500 veces nNOS/iNOS), la biodisponibilidad oral (60%) y reduce los efectos sobre hERG ( $IC_{50} > 30$   $\mu$ M).

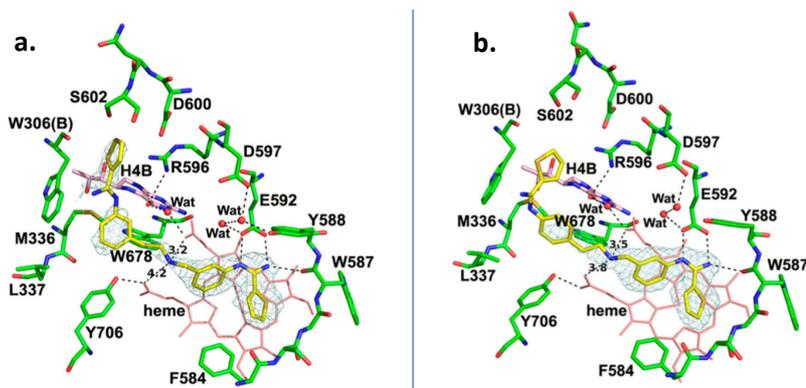


**Figura 11.** Derivados tienocarboximidamídicos diméricos.

Siguiendo la misma estrategia que en las aminopiridinas, los laboratorios Northwestern diseñaron moléculas con doble cabeza de tienocarboximidamida<sup>104</sup> dando lugar a **32** y **33** (Fig. 11), ambos muestran

excelente potencia ( $K_i = 5 \text{ nM}$ ) para nNOS y buena selectividad (alrededor de 300 veces nNOS/iNOS y alrededor de 500 nNOS/eNOS) en líneas celulares de melanoma.

Estudios cristalográficos posteriores<sup>104,105</sup> determinaron la importancia de las interacciones iónicas para la afinidad de este tipo de compuestos con el centro activo de la enzima, debido principalmente a las cargas presentes en un Glu, varios restos de Arg y los propionatos del grupo hemo. Este último es el lugar de anclaje de la cabeza de tienocarboximidamida. Sin embargo, son sutiles diferencias en interacciones electrostáticas a larga distancia las que determinan la selectividad por cada isoforma, siendo clave Asp602 en nNOS y Asn366 en eNOS. En el caso de los derivados híbridos, el anillo de fenilo (del extremo que no interacciona con el centro activo) se posiciona junto a Met336 en **32** y Trp306 en **33** (Imagen 6). En ambos casos el tener una cadena tan voluminosa fuerza al compuesto a alcanzar esta disposición.



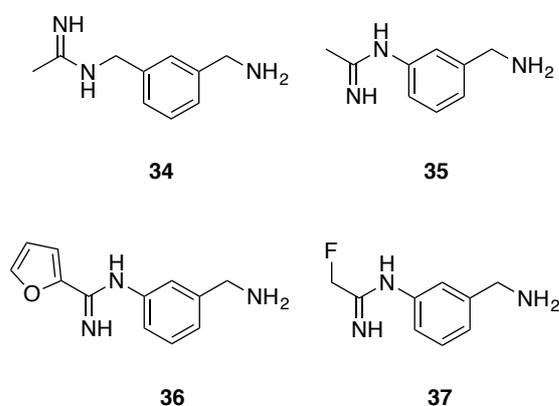
**Imagen 6.** Conformaciones preferentes de los compuestos **32** (a) y **33** (b) en nNOS.<sup>104</sup>

#### 1.8.1.6. Inhibidores derivados de 1400W

El 1400W **34**<sup>106</sup> (Fig. 12) es uno de los inhibidores selectivos más conocidos de iNOS, y desde su aparición se han intentado diversas modificaciones para transformarlo a un inhibidor nNOS selectivo y reducir la toxicidad que demostró en los ensayos clínicos.

GlaxoWellcome (predecesora de la actual Gsk) comenzó por acortar un metileno de la cadena lateral dando lugar a **35**, con  $K_i = 1 \mu\text{M}$  nNOS y baja selectividad (10 veces nNOS/iNOS y 33 veces nNOS/eNOS), pero suficiente para invertir la del compuesto original. La potencia se mejoró con **36** ( $K_i =$

6 nM) y **37** ( $K_i = 11$  nM), aunque la selectividad siguió siendo pobre. Otras propiedades de **37** son una excelente permeabilidad a través de la BHE y la capacidad de inhibir a nivel tisular en cerebro de rata *in vitro* y en cerebelo *in vivo*.



**Figura 12.** Inhibidores derivados de 1400W.

### 1.8.2. Inhibidores competitivos de la coordinación Fe-Hemo

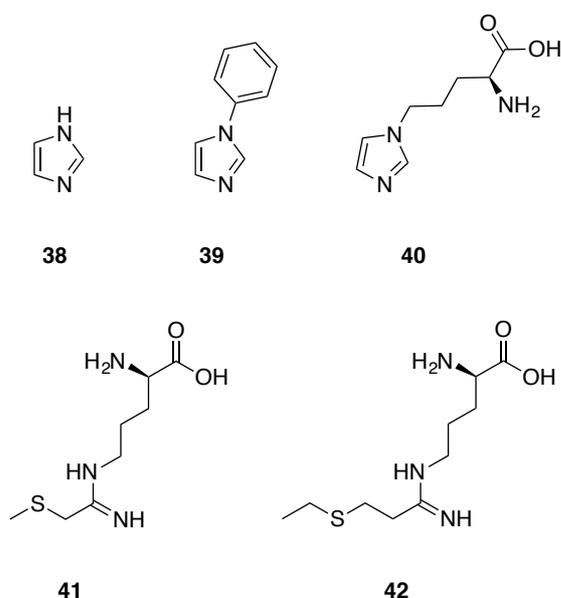
Otra de las aproximaciones a la inhibición de la NOS es la coordinación con el ion Fe del grupo hemo. Ya en 1993 se estudiaron ligandos como el imidazol **38**, que posee un efecto leve sobre la nNOS ( $IC_{50} = 200$   $\mu$ M), así como sus diferentes derivados monosustituídos, donde destaca **39** con  $IC_{50} = 25$   $\mu$ M<sup>107</sup> (Fig. 13). El efecto aumenta si el sustituyente no es muy voluminoso y no es muy electronegativo, puesto que al retirar densidad electrónica se debilita la unión Fe-N.

Alargar la longitud de la cadena lateral e incluir estructuras aminoacídicas mejora la potencia y la selectividad, como ocurre en **40**, cuya  $IC_{50} = 19$   $\mu$ M en nNOS le hace selectivo frente a eNOS e iNOS<sup>108</sup>.

A partir de otros grupos capaces de coordinarse con el hierro (tioéteres, tioles, aminas, tiazoles, tiofenos...) se desarrollaron una gran batería de compuestos que buscaban este mismo mecanismo. De entre ellos destaca **41** con una  $K_i = 0.37$   $\mu$ M para nNOS, 185 veces más efectivo que en eNOS.

Hasta 2009 no se consiguió cristalizar la primera estructura que mostrase una coordinación Fe-tioéter en nNOS: el derivado **42**.<sup>109</sup> Este estudio determinó que la unión azufre-hierro dependía del estado de oxidación de

este último, teniendo preferencia por  $\text{Fe}^{+2}$ . Al mismo tiempo, evidenció que este tipo de coordinación apenas ejerce influencia en la potencia de inhibición, puesto que compuestos en los que se apreciaban distancias mayores entre los dos átomos clave, resultaban ser los más efectivos *in vivo*. En el caso de **42**, con una estructura prácticamente idéntica a **41**, muestra una constante de inhibición  $K_i = 33 \mu\text{M}$  en nNOS. La potencia en estos compuestos viene determinada por los enlaces de hidrógeno generados con otros residuos de aminoácidos circundantes.



**Figura 13.** Inhibidores con coordinación con el grupo hemo.

### 1.8.3. Antagonistas de $\text{BH}_4$

La tetrahidrobiopterina es uno de los cofactores más importantes para la biocatálisis de L-Arg por la NOS. Cumple dos funciones: aporta electrones necesarios para que se produzca el proceso redox y también está implicada en estabilizar la dimerización de la enzima (imprescindible para su actividad). Por ello es una diana interesante para el desarrollo de inhibidores NOS.

### 1.8.3.1. Inhibidores duales substrato-BH<sub>4</sub>

El primer inhibidor descubierto de este tipo fue el 7-nitroindazol **43** (Fig. 14), pese a que *in vitro* es potente, no presenta selectividad entre isoformas (IC<sub>50</sub> = 0.47 μM nNOS de rata, IC<sub>50</sub> = 91 μM iNOS murina y IC<sub>50</sub> = 0.7 μM eNOS bovina)<sup>110</sup>, sin embargo, *in vivo* tiene alta selectividad por la isoforma neuronal, al no provocar eventos vasoconstrictores tras su administración por vía intravenosa o intraperitoneal<sup>111</sup>. Esto es debido a que solo en nNOS es capaz de inhibir con K<sub>i</sub> = 0.12 μM a BH<sub>4</sub> y simultáneamente a L-Arg.

Basándonos en los derivados del imidazol, aparece **44**, también conocido como TRIM, es capaz de inhibir con una potencia similar nNOS e iNOS (IC<sub>50</sub> = 28.2 μM nNOS de ratón y IC<sub>50</sub> = 27 μM iNOS de rata) y apenas alterando eNOS (IC<sub>50</sub> = 1057.5 μM eNOS bovina)<sup>112</sup>.

Curiosamente, dos de los metabolitos de las catecolaminas en condiciones de estrés oxidativo (**45** y **46**)<sup>113</sup>, son capaces de inhibir selectivamente la isoforma neuronal de la NOS con K<sub>i</sub> = 45 μM y 52 μM, respectivamente. La interacción dual con L-Arg y BH<sub>4</sub> se debe a la cadena lateral de aminoetilo.

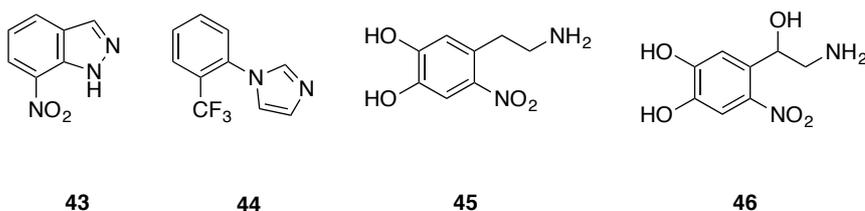
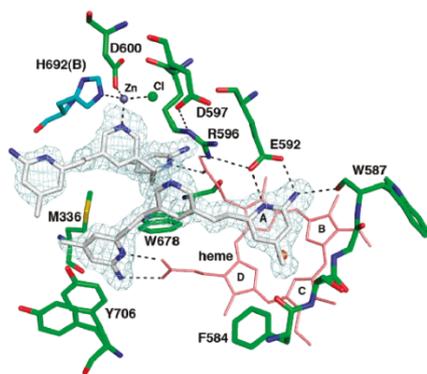


Figura 14. Inhibidores duales BH<sub>4</sub> – L-Arg.

En el año 2010, una serie de estudios cristalográficos realizados en nNOS utilizando los inhibidores diméricos de aminopiridinas descritos anteriormente (pag. 35, Fig. 8)<sup>91</sup> revelaron que, además de competir en el centro activo con L-Arg, ciertos miembros de esta familia podían alterar el lugar de unión de Zn<sup>2+</sup>.<sup>114</sup> Para este tipo de inhibición dual, la presencia y disposición del N en la cadena espaciadora es clave.

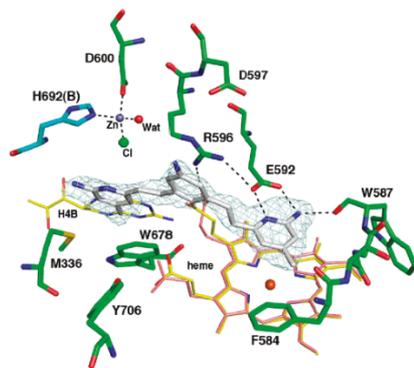
Hay dos posibilidades, en el caso de **18**, una de las cabezas de 2-aminopiridina se coordina con Glu592 y Trp587 por puentes de hidrogeno, mientras que la otra, gracias a interacciones π-π con Tyr706 y un puente de hidrógeno con el propionato del grupo hemo permite, de forma

inesperada, la unión de otra molécula de **18** en el sitio de BH<sub>4</sub> (Imagen 7). En primer lugar, el nitrógeno de la piridina central interactúa de forma directa con el átomo de Zn, lo que provoca un desplazamiento de los restos de Arg596, Glu592 y Asp600 en el sitio de unión de BH<sub>4</sub>, permitiendo la entrada de un segundo átomo de Zn que estrecha el espacio interfacial de los dos dímeros de la enzima (solamente apreciable en la isoforma neuronal).<sup>19</sup>



**Imagen 7.** Dos moléculas de **18** en los lugares de unión de L-Arg y BH<sub>4</sub> en nNOS.<sup>114</sup>

En **20** (Imagen 8) la situación cambia al requerirse una sola molécula para la inhibición dual. Una de las cabezas de aminopiridina interactúa con Arg596, mientras que la segunda reemplaza directamente a BH<sub>4</sub>, desplazando Trp678 paralelamente a la cadena espaciadora, esto deja espacio al ion Zn<sup>2+</sup> para coordinarse con Asp600 e His692.



**Imagen 8.** Interacción dual de **20** en los lugares de unión de L-Arg y BH<sub>4</sub> en nNOS.<sup>114</sup>

### 1.8.3.2. Antagonistas exclusivos de BH<sub>4</sub>

Mimetizar la estructura de la tetrahidrobiopterina **47** (Fig. 15), fue el primer acercamiento a la inhibición de la NOS por este mecanismo.

Modificaciones sobre el anillo de pteridina dieron lugar a **48** que presenta un grupo amino en posición 4, con IC<sub>50</sub> = 1 μM y K<sub>i</sub> = 13.2 nM para nNOS. Estudios REA llevaron a sustituir con cadenas alquílicas el grupo amino recién introducido y también incluir fragmentos arílicos en posición 6 para aumentar la selectividad por nNOS, como muestra **49**, con IC<sub>50</sub> = 3 μM<sup>115</sup>.

Un estudio más detallado de las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas en las posiciones 4, 5 y 6 del anillo de pteridina dieron lugar a **50**, de potencia y selectividad moderada (IC<sub>50</sub> = 3.68 μM en la isoforma neuronal, con selectividad 58.2 nNOS/iNOS y 8.62 nNOS/eNOS)<sup>116</sup>.

El 2-tiouracilo **51**, al poseer una estructura similar al núcleo de pirimidina de la BH<sub>4</sub>, es capaz de inhibir nNOS con K<sub>i</sub> = 20 μM, pero tiene la particularidad de que no participa en la transferencia electrónica necesaria para que la enzima actúe sobre L-Arg, y no estabiliza la unión de los dos monómeros.

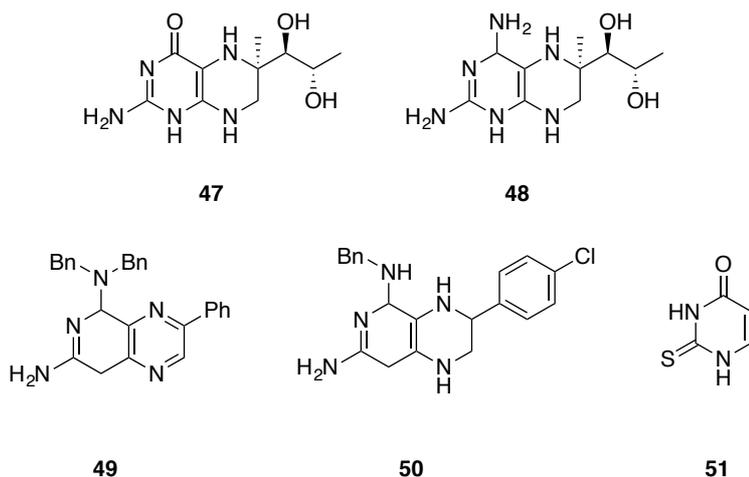
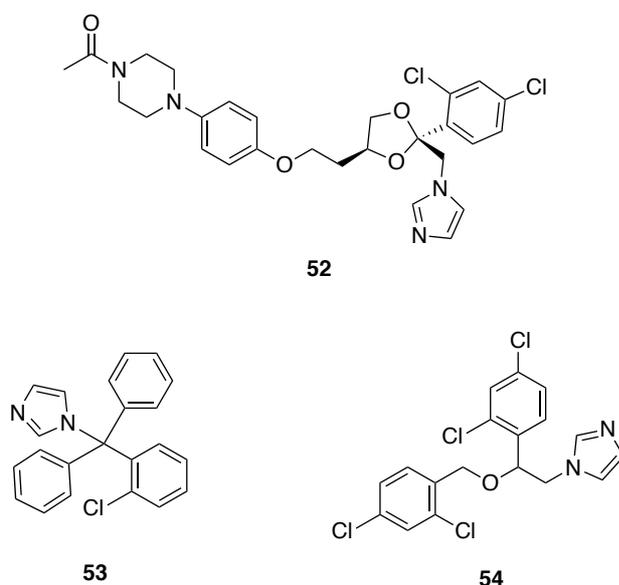


Figura 15. BH<sub>4</sub> e inhibidores exclusivos de BH<sub>4</sub>.

#### 1.8.4. Antagonistas de CaM

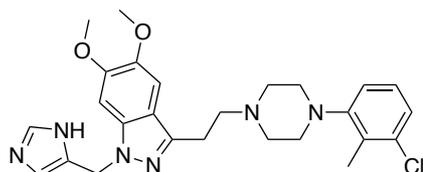
El anillo de imidazol, además de ser capaz de inhibir competitivamente el lugar de unión de  $BH_4$ , puede interactuar con la calmodulina. De entre los fármacos comercializados, los antifúngicos ketoconazol **52**, clotrimazol **53** y miconazol **54** mostraron una buena potencia frente a la NOS, con  $K_i = 44 \mu M$ ,  $19 \mu M$  y  $7 \mu M$ , respectivamente, pero ninguna selectividad frente a las diferentes isoformas (Fig. 16).<sup>117</sup>



**Figura 16.** Antagonistas de CaM basados en anillos de imidazol.

DY-9706e **55** es otro inhibidor de la nNOS ( $K_i = 0.9 \mu M$ ) que presenta cierta actividad inhibitoria frente a eNOS y ninguna frente a iNOS (Fig. 17). Este fármaco demostró, en estudios *in vivo*, actividad neuroprotectora en ratas con hipertensión crónica a las que se inducía una isquemia cerebral focal mediante operación quirúrgica<sup>118</sup>.

Resulta interesante el hecho de que **55** también sea capaz de inhibir otras enzimas CaM dependientes *in vitro*, (como CaM quinasa II y calcineurina, con  $K_i = 1.2$  y  $2 \mu M$ , respectivamente), pero no *in vivo*<sup>119</sup>. Además, el ionóforo A23187 sufre una reducción en el transporte de iones  $Ca^{+2}$  en presencia de este fármaco.



55

Figura 17. DY-9706e.

### 1.8.5. Inactivadores de nNOS

La inhibición de la nNOS mediante este mecanismo se basa, principalmente, en crear enlaces covalentes con el grupo hemo.

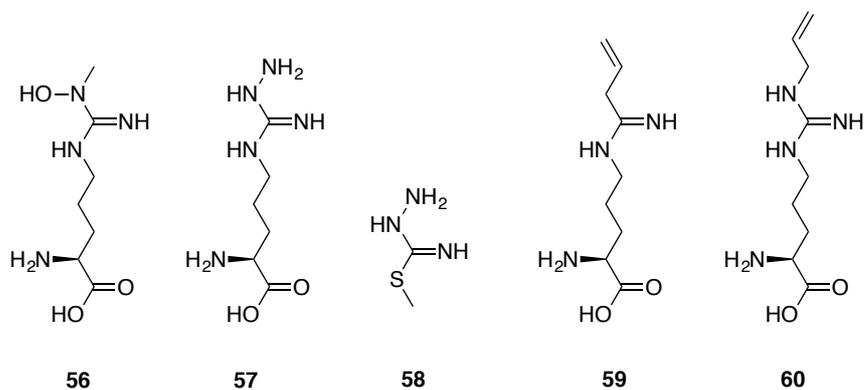
Uno de los primeros inhibidores que se desarrollaron, L-NMA **3** (Fig. 4, pag. 29), presenta un comportamiento de inhibidor dual reversible/irreversible para nNOS e iNOS<sup>120</sup>. La fijación irreversible deriva de la hidroxilación que sufre el compuesto al mimetizar la L-Arg, durante la primera reacción enzimática, formando L-NOHNMA **56** (Fig. 18), el cual carece de selectividad entre isoformas, limitando así su utilidad.

L-N<sup>G</sup>-Aminoarginina o L-NAA **57** ya era conocida como un inhibidor, con cierta selectividad frente a nNOS ( $K_i = 0.3 \mu\text{M}$ ) respecto de eNOS e iNOS ( $K_i = 2.5 \mu\text{M}$  y  $K_i = 3 \mu\text{M}$  respectivamente). Esto es debido a que en nNOS puede formar un enlace covalente con el grupo hemo tras liberarse una molécula de hidrazina, dando lugar a un residuo en el dominio oxigenasa que impide la catálisis de más sustrato<sup>121</sup>.

Otro compuesto de esta familia con estudios más detallados sobre la inactivación que producen es la 1-amino-S-metilisotiurea **58**, que resulta ser más efectiva en nNOS (iNOS:  $K_i = 1.1 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{inact}} = 0.75 \text{ min}^{-1}$ ; nNOS:  $K_i = 0.3 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{inact}} = 0.73 \text{ min}^{-1}$ )<sup>122</sup>.

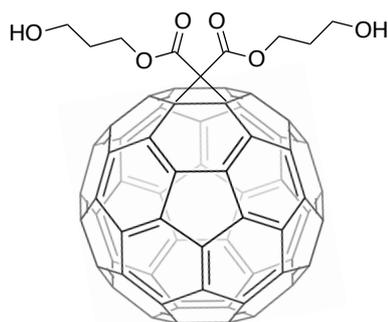
L-VNIO o N<sup>5</sup>-(1-imino-butenil)-L-ornitina **59**, muestra un gran poder de inactivación de la nNOS ( $K_i = 90 \text{ nM}$ ,  $k_{\text{inact}} = 0.05 \text{ min}^{-1}$ ), sin alterar de forma permanente a iNOS, y necesitándose hasta 20 veces más concentración en eNOS para alcanzar el 75% de la tasa de inactivación que presenta en nNOS.<sup>123</sup>

*N*<sup>ω</sup>-Alil-L-arginina **60** se puede comportar como un inhibidor reversible competitivo y también como un inactivador tiempo-dependiente de nNOS ( $K_i = 200$  nM,  $K_I = 470$  nM,  $k_{inact} = 0.05$  min<sup>-1</sup>)<sup>124</sup>, en este caso se pudo demostrar que el mecanismo de inactivación depende de la formación de un enlace covalente del resto alilo con el grupo hemo. De forma similar, la *N*<sup>ω</sup>-propil-L-arginina **4** (Fig. 4) (anteriormente descrita como inhibidor competitivo reversible) puede comportarse como un inactivador tiempo-dependiente ( $K_i = 57$  nM,  $K_I = 19.8$  nM,  $k_{inact} = 0.0059$  min<sup>-1</sup>)<sup>70</sup>.



**Figura 18.** Inactivadores de nNOS

Alejándonos de las estructuras clásicas de inhibidores de la NOS, aparecen los aductos de monomalonato de C<sub>60</sub>-fulereno, de entre los que destaca **61** (Fig. 19), capaz de inactivar nNOS de forma selectiva respecto de otras isoformas (nNOS IC<sub>50</sub> = 4 μM; iNOS IC<sub>50</sub> = 110 μM; eNOS IC<sub>50</sub> = 220 μM). En cuanto al mecanismo de inactivación, tras descartar cualquier tipo de interacción con los cofactores de la enzima, la teoría más probable es una alteración de la estructura de la enzima. Esto da lugar a una disrupción de la actividad normal (producir L-Cit y NO), hacia la producción de peróxidos y superóxidos. Los argumentos que respaldan esta teoría proceden de que solamente la inactivación aparece en presencia de L-arginina y que, en presencia de catalasas y superóxido dismutasas, pierde totalmente su efectividad.<sup>125</sup>



61

Figura 19. Di(carboxipropan-3-ol) metano-[60]-fulereno.

#### 1.8.6. Inhibidores duales de nNOS y otras dianas

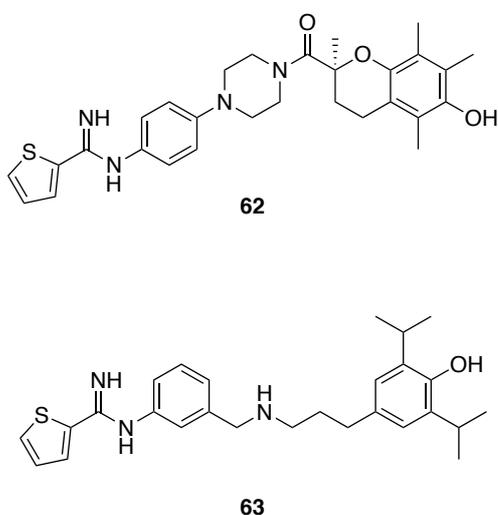
Las enfermedades neurodegenerativas cursan con una conjunción de diversos desequilibrios en varias rutas enzimáticas, por lo que el desarrollo de moléculas capaces de actuar en más de una diana terapéutica puede resultar en mejores fármacos contra estas enfermedades.

Uno de los principales factores que desencadena procesos neurodegenerativos es el estrés oxidativo, siendo las especies reactivas de oxígeno (ROS) especialmente dañinas para las neuronas.<sup>126</sup>

Los compuestos que unen la inhibición de la nNOS con la reducción de ROS, dan lugar a una sinergia que se hace patente en **62** (Fig. 20), el cual combina, gracias a un linker de piperidina, una cabeza de tienocarboximidamida (inhibidor contrastado nNOS) con un fragmento antioxidante análogo de la vitamina E.

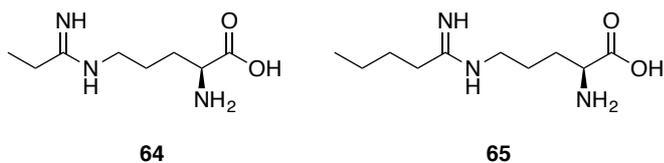
En los ensayos biológicos *in vitro* este derivado mostró una  $K_i = 0.92 \mu\text{M}$  para nNOS con buena selectividad frente a otras isoformas (nNOS/iNOS > 300; nNOS/eNOS = 111) y gran capacidad antioxidante ( $\text{IC}_{50} = 0.29 \mu\text{M}$ ). Cuando se ensayó *in vivo* por inducción de isquemia focal en ratas, llegó a reducir hasta en un 70% el volumen de los infartos cerebrales, en el modelo de isquemia global en gerbo logró una supervivencia del 64% de las neuronas del hipocampo frente al 26% de los controles, y en el modelo de trauma cerebral en ratón redujo en un 58% las secuelas motoras.<sup>127</sup>

Después de diversos estudios REA se sintetizó **63**, una molécula optimizada para mejorar la inhibición nNOS ( $K_i = 0.12 \mu\text{M}$ ), sacrificando un poco su selectividad (nNOS/iNOS > 150; nNOS/eNOS = 67.6), pero manteniendo la actividad antioxidante ( $\text{IC}_{50} = 0.4 \mu\text{M}$ ).<sup>128</sup>



**Figura 20.** Inhibidores duales NOS/ROS.

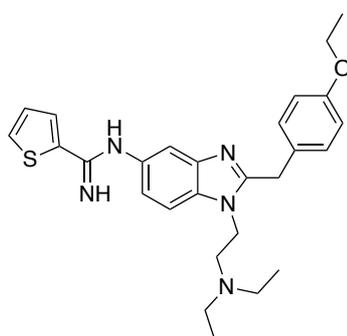
Otra posibilidad es la inhibición dual nNOS/DDAH-1, esta segunda enzima (dimetilarginina dimetilamino hidrolasa) cumple un papel importante en la regulación del funcionamiento de la NOS, siendo la encargada de reducir la concentración de los inhibidores endógenos de NOS, como  $N^{\omega}$ -metil-L-arginina **3** y  $N^{\omega},N^{\omega}$ -dimetil-L-arginina. Las estructuras de estos compuestos derivan de la  $L$ - $N^5$ -(1-iminoetil)ornitina, cambiando la longitud de la cadena alquílica. Algunos ejemplos son: **64** con  $K_i = 3 \mu\text{M}$  en nNOS y  $K_i = 52 \mu\text{M}$  en DDAH-1, y **65** con  $K_i = 20 \mu\text{M}$  en nNOS y  $K_i = 7.5 \mu\text{M}$  en DDAH-1. El problema que acompaña a esta familia de inhibidores es una falta de selectividad entre isoformas, puesto que la DDAH-1 las regula a todas.<sup>129</sup>



**Figura 21.** Inhibidores duales nNOS/DDAH-1.

Combinar la inhibición de la nNOS con el efecto analgésico de los opiáceos es una estrategia patentada por Ramnauth et al.<sup>130</sup> para el tratamiento de

dolores neuropáticos. Utilizando una cabeza de tienamidina y la estructura de un benzimidazol derivada de un opiáceo potente se consigue **66**, el cual tiene una buena actividad nNOS ( $IC_{50} = 0.44 \mu M$ ), con moderada selectividad frente a otras isoformas (nNOS/iNOS = 125; nNOS/eNOS = 10) y gran capacidad agonista en receptores opioides  $\mu$  ( $K_i = 5.4 nM$ ).<sup>131</sup>



**66**

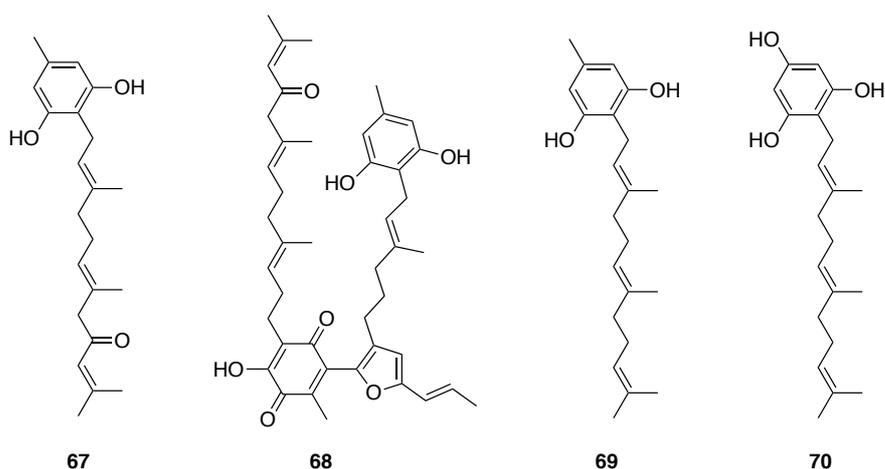
**Figura 22.** Inhibidor nNOS/Agonista  $\mu$ .

### 1.8.7. Inhibidores iNOS derivados de la naturaleza

Desde los albores de la medicina es conocida la utilización de plantas para el tratamiento de procesos inflamatorios. Gracias a los avances científicos, a día de hoy hemos podido descifrar qué parte de las propiedades de estos antiguos remedios es debida a la inhibición de la isoforma inducible de la NOS.

De entre la gran diversidad de moléculas aisladas con capacidad de reducir la producción de NO, determinar qué estructuras y grupos funcionales son los imprescindibles para producir este efecto, es clave para el desarrollo de derivados sintéticos potentes y selectivos.

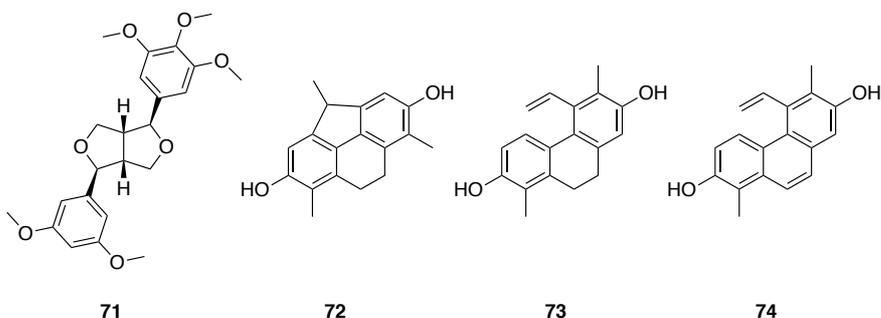
Comenzando con compuestos fenólicos, en *Albatrellus caeruleoporus* aparecen farnesil derivados como las grifolinonas A **67** y B **68**, grifolina **69** y neogrifolina **70** (Fig. 23), con  $IC_{50}$  de 23.4, 22.9, 29.0 y 23.3  $\mu M$ , respectivamente. Estudios REA determinaron que los grupos funcionales responsables de la inhibición iNOS son los hidroxilos del anillo aromático y la presencia de una cetona conjugada en la cadena lateral.<sup>132</sup>



**Figura 23.** Derivados fenólicos del farnesilo.

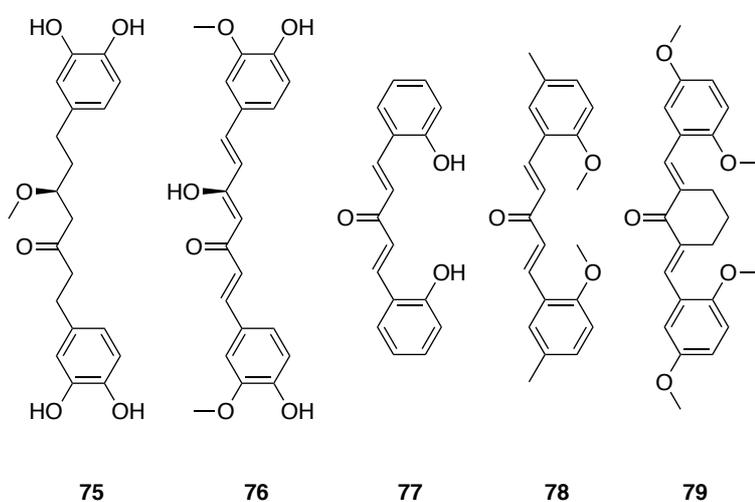
En la familia de los lignanos destaca la epimagnolina B **71** (Fig. 24), extraída de *Magnolia fargesii* con  $IC_{50}$  de  $10.9 \mu M$ . Esta ejerce su efecto a través de un mecanismo que inhibe la degradación de I- $\kappa$ B- $\alpha$  y la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. Al ser comparada con otros lignanos, se logra descifrar que la orientación de los anillos aromáticos influye en la potencia del compuesto.<sup>133</sup>

En los rizomas de *Juncus acutus* aparecen los fenantrenoides juncutol **72**, juncusol **73** y dehidrojuncusol **74**, capaces de inhibir selectivamente la expresión de iNOS en una concentración de  $10 \mu M$  en macrófagos RAW-264.7 estimulados por LPS; los niveles de iNOS frente al control fueron de 11.2%, 35.0% y 59.0%, respectivamente. Los estudios REA sacan a relucir que los hidroxilos en posición 2 y 7 (ambos aromáticos) son importantes para la actividad.<sup>134</sup>



**Figura 24.** Lignanos y fenantrenoides.

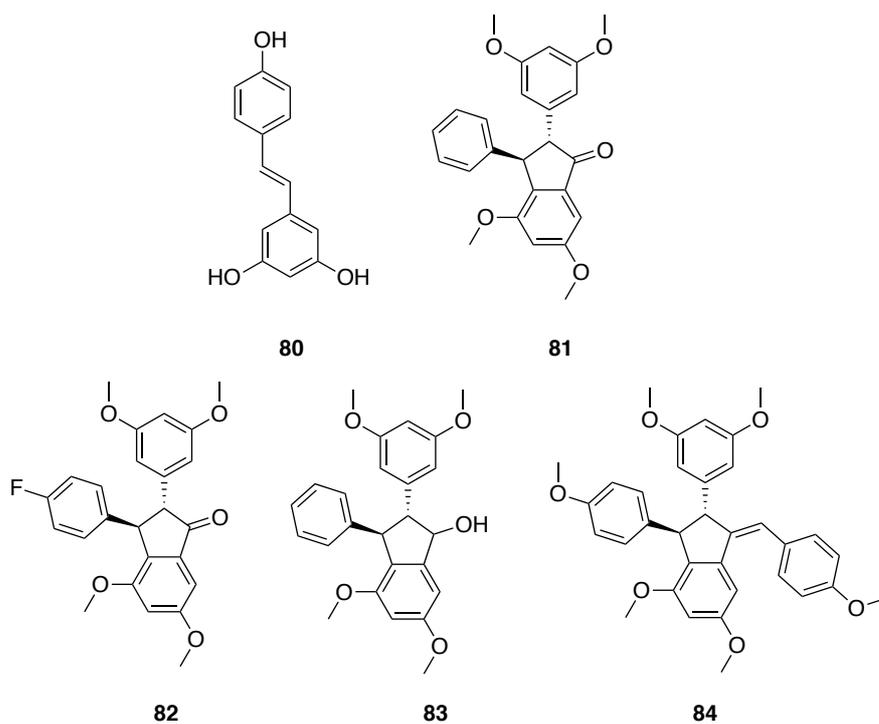
De las hojas de *Alnus japonica* se consiguió aislar un compuesto capaz de inhibir tanto la producción de NO dependiente de NF-κB, con  $IC_{50} = 14.5 \mu M$ , como la expresión de proteínas y ARN mensajero de iNOS en células RAW 264.7, el 5-O-metilhirsutanol **75**<sup>135</sup> (Fig. 25).



**Figura 25.** Curcumina y derivados.

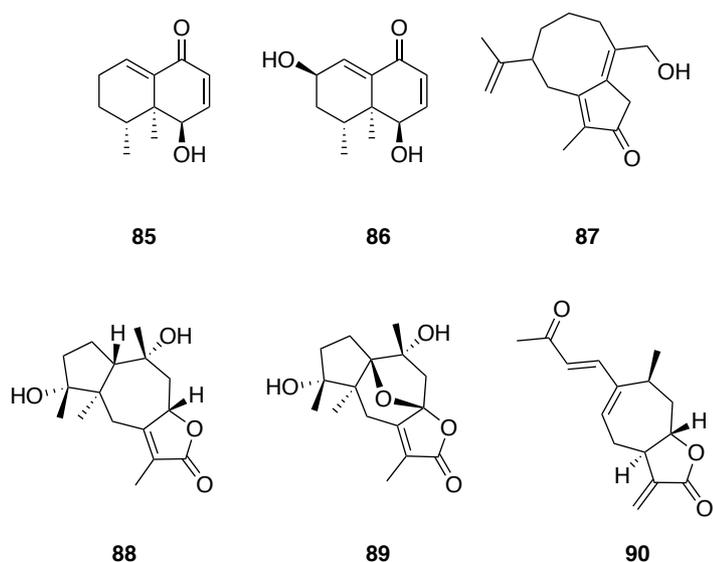
La curcumina **76** y sus derivados **77 - 79** presentan respectivamente unas  $IC_{50}$  de 20.38, 10.24, 13.64 y 13.66  $\mu M$  para la inhibición de la expresión iNOS en macrófagos activados con IFN- $\gamma$  y LPS. En este caso los metoxilos en 2 y 5 de los anillos fenólicos son claves para dicha inhibición.<sup>136</sup>

El resveratrol **80** es otro polifenol, derivado esta vez del estilbeno, que se encuentra especialmente concentrado en la uva y sus derivados (Fig. 26). Es utilizado por sus características antioxidantes y antiinflamatorias. Zhong et al<sup>137</sup> sintetizaron una serie de análogos a precursores metoxilados dimerizados (**81 - 84**), obteniendo inhibición de la expresión de iNOS en células RAW 264.7 inducidas por LPS, sus  $IC_{50}$  son 27.1, 44.7, 3.3 y 6.2  $\mu M$ , respectivamente.



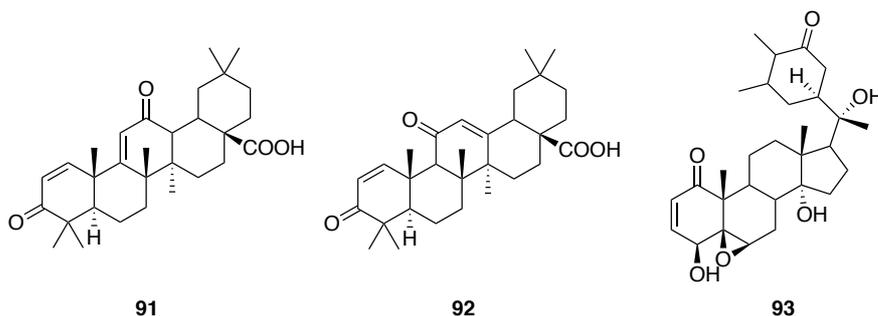
**Figura 26.** Resveratrol y sus derivados.

Otra gran rama de productos naturales capaces de disminuir la producción de NO son los derivados terpénicos. La gran mayoría de los compuestos activos de esta familia son los sesquiterpenos, en *Nardostachys chinensis* destacan el desoxo-narquinol A **85** y el narquinol B **86** (Fig. 27), cuyas  $IC_{50}$  son 8.4 y 4.6  $\mu M$ , respectivamente<sup>138</sup>. De *Wistroemia indica* podemos extraer la indicanona **87**, con  $IC_{50} = 9.3 \mu M$ <sup>139</sup>. Dos compuestos aislados de *Curcuma phaeocaulis*: **88** y **89**, poseen  $IC_{50} < 2 \mu M$  para la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 inducidos por LPS, en estos compuestos es clave la orientación de los hidrógenos o el epóxido por encima del plano de la molécula.<sup>140</sup> Por último, queda una molécula aislada en *Xanthium strumarim*: la xantatina **90**, la cual en células microgliales BV-2 activadas por LPS muestra una  $IC_{50}$  para iNOS de 0.47  $\mu M$ , lo que la convierte en la más potente de todos los sesquiterpenos; en este caso, el anillo de lactona junto al grupo metileno en *exo*, le confieren la capacidad de inhibir iNOS a través de la degradación de I- $\kappa$ B- $\alpha$  y la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>141</sup>



**Figura 27.** Derivados sesquiterpénicos.

Los esteroides **91** y **92** (Fig. 28), derivados del ácido oleanólico, mostraron una potente inhibición de la producción de NO en macrófagos de ratón inducidos por IFN- $\gamma$ , con  $IC_{50}$  = 0.9 y 1.8  $\mu$ M, respectivamente. La máxima potencia se alcanza gracias al grupo carboxilo en C-17 y a la conjugación cetona-doble enlace en los anillos A y C, siendo en este caso preferibles los sustituyentes hidrofílicos a los hidrofóbicos.<sup>142</sup>



**Figura 28.** Derivados esteroideos y triterpénicos.

En la familia de las Solanáceas existen unos metabolitos secundarios conocidos como withanolidas, estos se encuentran principalmente en la parte aérea de las plantas y poseen diversas propiedades relacionadas con la inhibición de la producción de NO. Los ensayos con la 4 $\beta$ -hidroxiwitanolida **93**, aislada de *Physalis peruviana*, en macrófagos de ratón RAW-264.7 activados por LPS, mostraron una inhibición iNOS de  $IC_{50}$

= 0.32  $\mu\text{M}$ , al impedir la expresión de la enzima a nivel del ARN mensajero.<sup>143</sup>

### 1.8.8. Inhibidores iNOS amidínicos

Los compuestos cuya estructura contenga guanidina, o cualquiera de sus isómeros, poseen un gran potencial para inhibir de forma competitiva a todas isoformas de la NOS, siendo los grupos funcionales que la rodean los encargados de conferirle la selectividad por cada una de ellas. En este apartado nos centraremos en las dirigidas hacia iNOS.

En el “Dipartimento di Farmacia” de la “Università degli studi Gabriele d'Annunzio” en Chieti (Italia) han trabajado de forma intensiva en este tipo de compuestos. De toda su producción científica destacan las estructuras derivadas de 1400W **34** (Fig. 12, pag. 39), de las que se muestran algunos ejemplos en la figura 29.

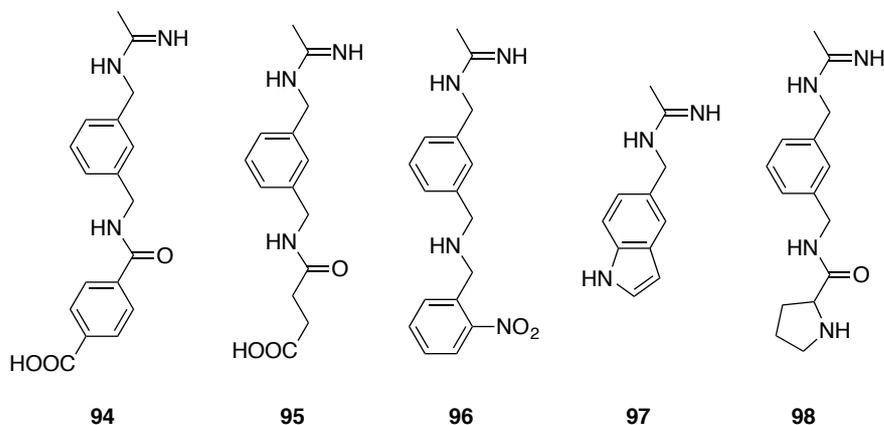


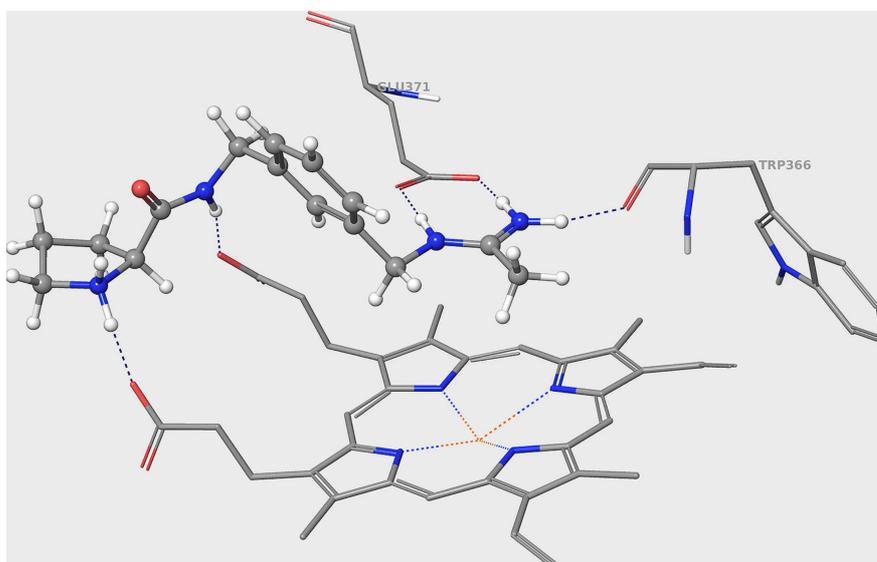
Figura 29. Inhibidores amidínicos.

En los tres primeros compuestos **94**, **95** y **96**, se consiguieron respectivamente valores de  $\text{IC}_{50}$  = 0.165, 0.428 y 0.1  $\mu\text{M}$  para iNOS, con buena selectividad frente eNOS de 550, 2300 y 300 veces, respectivamente.<sup>144</sup>

La introducción del anillo de indol y el espaciador de metileno en **97** consiguió alcanzar una  $\text{IC}_{50}$  de 53 nM para iNOS, mientras que a concentración 10  $\mu\text{M}$  no afectó a nNOS ni a eNOS.<sup>145</sup>

Por último, **98** mostró una gran potencia *in vitro* para iNOS ( $\text{IC}_{50}$  = 0.058 $\mu\text{M}$ ), 4569 veces más que por eNOS y sin afectar la actividad de nNOS

a 10  $\mu\text{M}$ . Los estudios de docking revelan que la fracción de acetamida interactúa con Glu y Trp del centro activo de la enzima, el nitrógeno del grupo amida se orienta hacia uno de los grupos propionato de hemo y el resto de la prolina crea puentes de hidrógeno con el otro propionato del grupo hemo (Imagen 9).<sup>146</sup> Con motivo de estas esperanzadoras cualidades, este compuesto fue ensayado en células de glioma de rata C6, donde mostró tener efecto citotóxico y antiproliferativo exclusivo para las células tumorales.



**Imagen 9.** Interacciones responsables de la unión de **98** en el centro activo de iNOS.<sup>146</sup>

### 1.8.9. Inhibidores de la dimerización iNOS

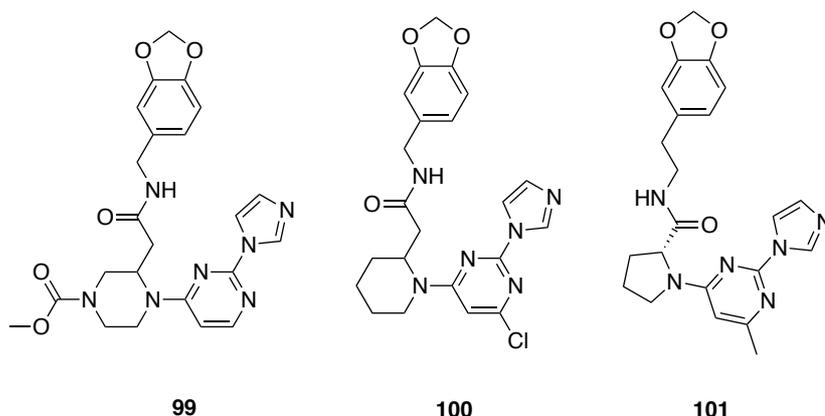
Basándonos en la estructura que posee la enzima NOS en su forma activa, es decir, en forma de homodímero, se abre la posibilidad de un nuevo mecanismo de inhibición: impedir la unión de las dos subunidades que la forman.

Los inhibidores de esta familia se descubrieron gracias a la utilización de una biblioteca de compuestos basada en un núcleo de pirimidina-imidazol, y han sido diseñados principalmente para ser selectivos iNOS, bloqueando las interacciones proteína-proteína.

Como resultado se obtuvo el compuesto **99**<sup>147</sup> (Fig. 30), el más efectivo de la primera serie, con potencia elevada incluso siendo el primer inhibidor de este tipo ( $i\text{NOS}$ :  $\text{IC}_{50} = 28 \mu\text{M}$ ), selectividad moderada ( $i\text{NOS}/n\text{NOS} = 5$ ;  $i\text{NOS}/e\text{NOS} = 1000$ ) y buena biodisponibilidad oral. Además, es eficaz al utilizarse vía subcutánea en modelos de artritis reumatoide inducida en rata.

Mejoras sobre esta misma estructura consiguieron alcanzar valores de  $\text{IC}_{50}$  subnanomolares como en **100**, donde su  $\text{IC}_{50} = 0.49 \text{ nM}$  para  $i\text{NOS}$  y manteniendo aproximadamente la selectividad ( $i\text{NOS}/n\text{NOS} = 5$ ;  $i\text{NOS}/e\text{NOS} = 1100$ ) y **101**, el mejor hasta la fecha tanto en potencia ( $\text{IC}_{50} = 0.29 \text{ nM}$ ), como en selectividad ( $i\text{NOS}/n\text{NOS} = 62$ ;  $i\text{NOS}/e\text{NOS} > 5000$ ).

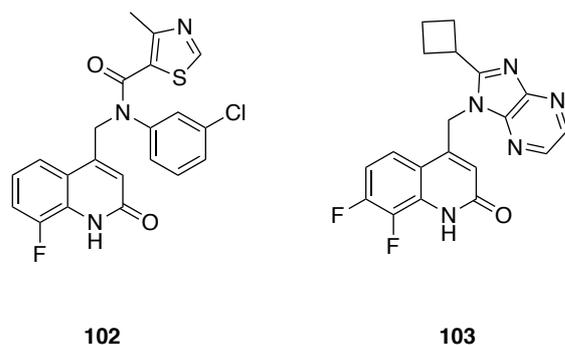
148



**Figura 30.** Inhibidores de la dimerización basados en pirimidina-imidazol.

Posteriormente se sintetizaron derivados de quinolinonas entre los que destacó en un primer momento **102** (Fig. 31), con elevada potencia ( $\text{EC}_{50} = 0,011 \mu\text{M}$ ) y buena selectividad ( $i\text{NOS}/n\text{NOS} = 210$ ;  $i\text{NOS}/e\text{NOS} = 2300$ ); a la hora de los ensayos *in vivo* en ratones, mostró una buena biodisponibilidad oral, pero una corta vida media debido a un alto aclaramiento renal.<sup>149</sup>

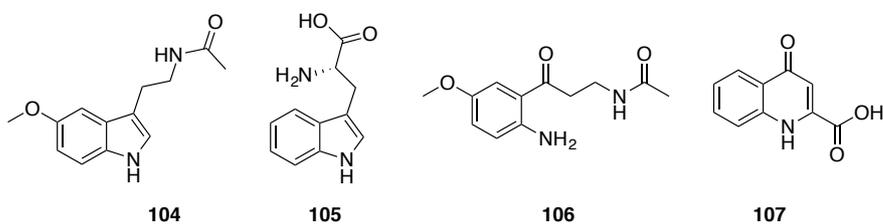
Con el fin de subsanar estas deficiencias se enmascaró el grupo amida debido a su labilidad, y se introdujeron restricciones conformacionales en la cadena lateral al formar un anillo de bencimidazol, apareciendo así **103**, algo menos potente ( $\text{EC}_{50} = 0,091 \mu\text{M}$ ) y con menor selectividad ( $i\text{NOS}/n\text{NOS} = 3$ ;  $i\text{NOS}/e\text{NOS} = 180$ ), pero con una alta estabilidad microsomal y eficacia probada en modelos de dolor e inflamación en ratones y primates.<sup>150</sup>



**Figura 31.** Inhibidores de la dimerización basados en quinolinonas.

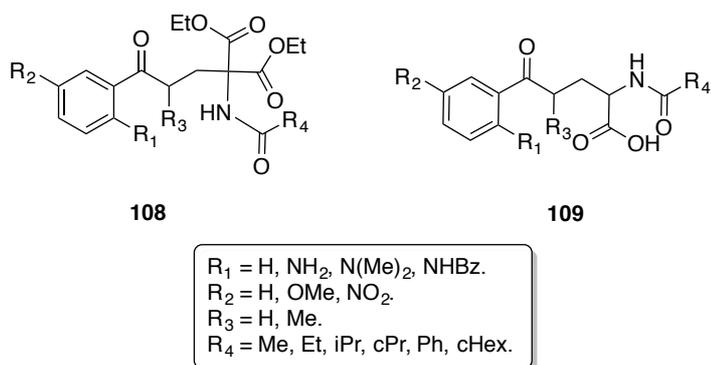
### 1.8.10. Antecedentes de nuestro grupo de investigación

La actividad científica de nuestro grupo de investigación en la rama de los inhibidores NOS comienza a raíz de un estudio sobre los efectos neuroprotectores de una molécula producida en la glándula pineal: la melatonina **104**.<sup>151</sup> Esta hormona se produce a partir del L-triptófano **105** y posee una actividad inhibitoria frente a nNOS de  $IC_{50} = 0.1 \mu M$ , esta inhibición es dependiente de CaM y solo se produce tras un tiempo de latencia. Esto hizo sospechar que el efecto lo provocaba uno de sus metabolitos. La principal ruta por la que la melatonina se degrada es a través de la indolamina-2,3-dioxigenasa, dando lugar a *N*-acetil-5-metoxikinurenamina (aMK) **106**.<sup>152</sup> En la ruta metabólica del triptófano existe otro compuesto con actividad neuroprotectora, el ácido kinurénico **107**, similar al aMK que acabamos de enunciar.



**Figura 32.** Melatonina, triptófano, aMK y ácido kinurénico.

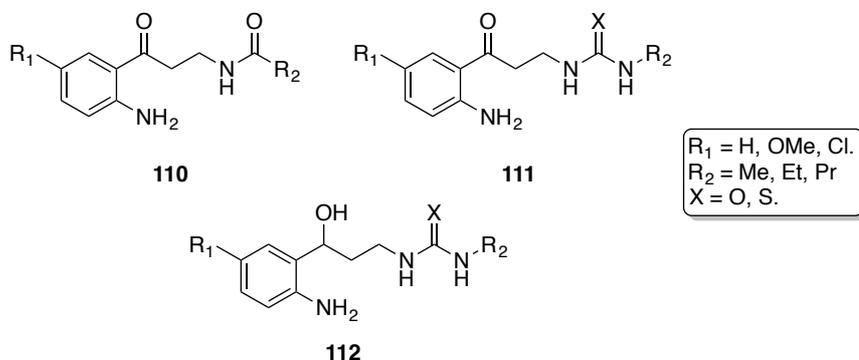
A partir de estas estructuras, se decidió desarrollar análogos para determinar las zonas claves para la actividad inhibitoria, apareciendo así los derivados kinurenínicos de estructura general **108** y **109**.<sup>153</sup>



**Figura 33.** Derivados kinurenínicos.

En esta serie de compuestos, el más activo resultó ser un derivado de **109** con R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = OMe, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = Me (IC<sub>50</sub> = 40.9 μM)<sup>153</sup>. La suma de todos los resultados biológicos, unido a estudios conformacionales, permitió llegar a la conclusión de que el grupo amino en R<sub>1</sub> es imprescindible para la actividad.

Para la familia de las kinurenaminas (Fig. 34)<sup>154</sup> se sintetizaron análogos estructurales al aMK, que posee una IC<sub>50</sub> = 70 μM<sup>155</sup>. En la primera serie (estructura **110**), los compuestos resultaron ser todos menos activos que la molécula de la que derivaban, aun así, se pudo determinar que aumentar el volumen del sustituyente R<sub>2</sub> conllevaba una pérdida de actividad inhibitoria; del mismo modo, los grupos funcionales electrón-donantes en R<sub>1</sub> producían inhibiciones mayores que los electrón-atrayentes.

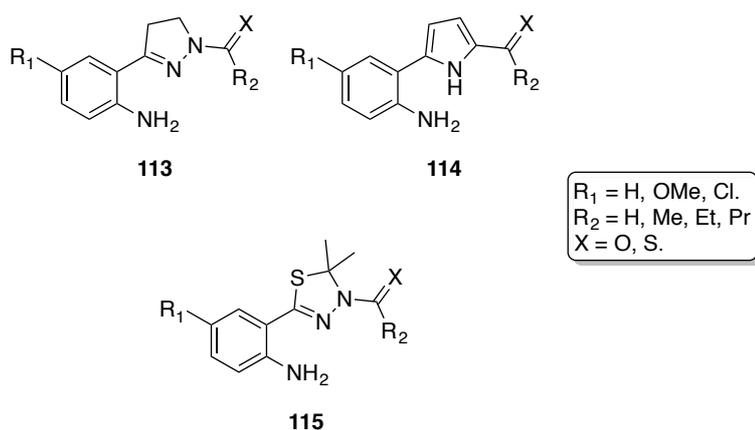


**Figura 34.** Derivados kinurenamínicos.

Explorando modificaciones en la cadena lateral, se decidió generar un núcleo de urea o tiourea, isómeros de la guanidina presente en L-Arg,

dando lugar a los compuestos con estructura general **111**.<sup>156</sup> Del mismo modo, se sintetizan los derivados hidroxilados **112**.<sup>157</sup> Curiosamente, los porcentajes de inhibición aumentan, pero solo en la isoforma inducible; alcanzando el máximo con  $IC_{50} = 100 \mu M$  sin afectar a eNOS, para el derivado de **111** con  $R_1 = Cl$ ,  $R_2 = Et$ ,  $X = O$ . En cuanto a los derivados de **112**, pierden selectividad y potencia, siendo el mejor aquél con  $R_1 = OMe$ ,  $R_2 = Me$ ,  $X = S$ , teniendo una  $IC_{50} = 130 \mu M$  para nNOS y  $180 \mu M$  para iNOS, sin afectar a eNOS.<sup>157</sup>

Por último, el desarrollo de estos inhibidores evolucionó hacia análogos rígidos de la cadena lateral, donde se introdujeron anillos de 5 miembros (pirazol **113**<sup>158</sup>, pirrol **114**<sup>159</sup> o tiadiadiazol **115**<sup>160</sup>).



**Figura 35.** Análogos rígidos.

Estudios de docking revelan que, gracias a estos nuevos anillos, el grupo amino crea un enlace de hidrógeno intramolecular que permite imitar la conformación que adopta la melatonina en el centro activo.

Los más activos resultaron ser las tiadiazolinas **115**, con  $IC_{50}$  entre 20 y 40  $\mu M$  para iNOS, sin afectar a eNOS.



## 2. Objectives



The main goal of this doctoral thesis is the design, synthesis and biological evaluation of new carboxamidic and imidamidic derivatives as inhibitors for the different NOS isoforms. By this means, we are able to contribute developing potent and selective compounds to target NO overproduction in potential drugs for the diseases where is involved.

The specific objectives necessities for this purpose are:

- I. Following the path of previous articles from our research group, design new compounds blending together the characteristics which proportionate the highest selectivity and the most potent inhibition in each NOS isoform.
- II. Incorporate amidine and guanidine substructures, proven in bibliography to be great moieties for NOS inhibition, to our own molecules.
- III. Develop a synthetic strategy that will allow obtaining the final products with the highest yield possible.
- IV. Purification and characterization of any new molecule synthesized by nuclear magnetic resonance studies (NMR) and high resolution mass spectrometry (HRMS).
- V. Biological activity determination for the neuronal and inducible NOS isoforms in all the final products, and in the endothelial one on those with the best inhibition values.
- VI. Analyze how the structural modifications influence on the potency and selectivity of the inhibitors.



### 3. Materiales y métodos



En este apartado debemos diferenciar entre las dos principales ramas de trabajo, la síntesis química y la evaluación biológica.

### 3.1. Síntesis química

Comenzaremos por la síntesis química, detallando los métodos sintéticos utilizados para la consecución de los diferentes productos finales, así como su descripción y caracterización espectroscópica.

#### 3.1.1. Condiciones generales

Las condiciones generales para las diferentes reacciones químicas llevadas a cabo fueron muy variadas, habiendo utilizado temperaturas que varían desde -78 °C (gracias a baños tipo “Dewar” conteniendo nieve carbónica y acetona) hasta los 140 °C por baños de silicona líquida (Scharlau SI 0025) y placas térmicas (IKA C-MA6 HS-7) .

Los disolventes utilizados en todas las reacciones de esta tesis son de origen comercial (Honeywell Riedel-de-Haen, Acros Organics, VWR Chemicals BDH). Los disolventes deuterados necesarios para la caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN) provienen de la casa Euroisotop.

Los reactivos empleados en estas síntesis se encuentran disponibles en casas comerciales como Sigma Aldrich (ahora Merk) y Acros Organics.

De forma general el método utilizado para el control del avance de las reacciones, así como de los sucesivos pasos requeridos posteriormente para su tratamiento y purificación, fue la cromatografía en capa fina (también conocida como TLC por sus siglas en inglés). A partir de placas de 20x20 se dividieron hasta el tamaño adecuado para después desarrollarlas en la mezcla de eluyentes indicada en cada caso. Los reveladores utilizados fueron las luces ultravioletas de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) para productos con dobles enlaces conjugados y ninhidrina para diferenciar productos nitrogenados.

La purificación de los productos se llevó a cabo gracias a la cromatografía en columna con gel de sílice 60, 0,04 – 0,06 mm (230 – 400 mesh ATSM). Los disolventes utilizados y su proporción se detallan en cada caso.

Los puntos de fusión se midieron en un Stuart Scientific Melting Point apparatus SMP3 y no están rectificadas.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) tanto unidimensionales ( $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN) como bidimensionales (HMBC y HSQC) se realizaron en las instalaciones del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, concretamente en aparatos BRUKER Avance NEO con sonda Smart Probe BBFO y potencias de 400 MHz y 100 MHz, 500 MHz y 125 MHz ó 600MHz y 150 MHz.

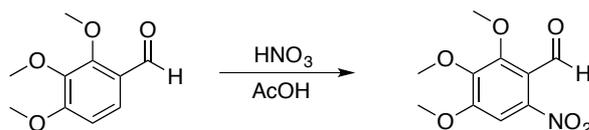
Las señales que aparecen en los espectros se describen de mayor a menor desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm, concretando a continuación la multiplicidad de la señal, el número de núcleos que incluye, la posición que ocupan en la estructura y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz que presentan.

Las multiplicidades aparecen abreviadas y se encuentran recogidas entre las siguientes posibilidades: singlete (s), singlete ancho (sa), doblete (d), doble doblete (dd), doble doble doblete (ddd), doble doble doble doblete (dddd), triplete (t), doble triplete (dt), triple triplete (tt), cuadruplete (q) y multiplete (m).

La Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS) se llevó a cabo en la sede de la Facultad de Farmacia del Centro de Instrumentación Científica, en un Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal LCT Premier XE.

### 3.1.2. Síntesis de la Familia A

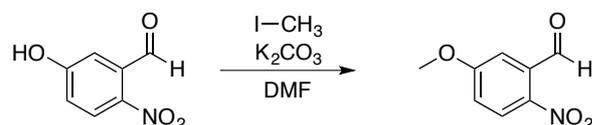
#### 2,3,4-Trimetoxi-6-nitrobenzaldehído (116a)<sup>161</sup>



En 10 ml de una disolución de ácido acético glacial y ácido nítrico concentrado a partes iguales, se añaden 10.2 mmol (2 g) de 2,3,4-trimetoxibenzaldehído, enfriando a 0 °C con baño de hielo. La mezcla se deja agitar durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se procede a extraer

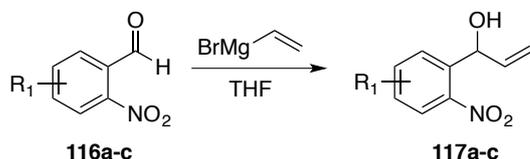
con AcOEt (3 x 10 ml), las fases orgánicas se unen para ser lavadas con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 ml), posteriormente se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtran para concentrar al rotavapor. Se purifica por columna cromatográfica de silicagel, mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:2). Se obtienen 8.67 mmol (2.09 g) de un sólido amarillo cristalino Rto: 85% con Pf: 81 - 84 °C.

#### 5-Metoxi-2-nitrobenzaldeído (116c)<sup>162</sup>



Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar procedemos a disolver 10 mmol (1.67 g) de 5-hidroxi-2-nitrobenzaldeído en 30 ml de DMF anhidra. A continuación, añadimos 11mmol (1.51 g) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y dejamos 1 hora bajo agitación, lo que permitirá la formación del fenolato. Posteriormente, se añaden 15 mmol (0.93 ml) de yodometano y se agita durante 24 horas más. Una vez terminada la reacción, se concentra a rotavapor con bomba de aceite para eliminar el exceso de DMF. El crudo resultante se somete a una extracción con H<sub>2</sub>O y AcOEt, extrayendo repetidas veces la fase acuosa. Se reúnen las fases orgánicas, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtran para concentrarlas al rotavapor. Se purifica por columna cromatográfica de silicagel, usando como eluyente mezcla de AcOEt:Hex (1:4). Se obtienen 10 mmol (1.81 g) de un sólido amarillo cristalino, rendimiento cuantitativo, Pf: 84 - 86 °C.

#### Procedimiento general para la obtención de los derivados de 1-fenilprop-2-en-1-ol (117a-c)

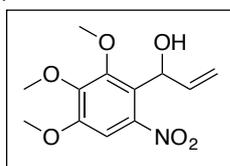


Una solución de 6 mmol del correspondiente derivado **116a-c** en 25 ml de THF se lleva a - 70 °C por baño de acetona-hielo seco. A continuación, se añaden 8.4 mmol de una disolución 1 M de bromuro de vinilmagnesio en THF y se mantiene agitando durante 3.5 horas. Transcurrido este tiempo, se añaden 20 ml de una disolución 0.1 N de HCl, seguidamente, esta mezcla se concentra al rotavapor para eliminar el disolvente orgánico. La fase acuosa resultante se extrae con AcOEt (3 x 30 ml), la fase orgánica se

lava con salmuera, se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, después se filtra y concentra al rotavapor. Se purifica por columna cromatográfica de silicagel, mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:7).

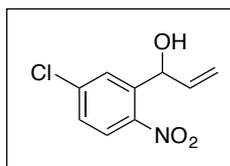
### 1-(2,3,4-Trimetoxi-6-nitrofenil)prop-2-en-1-ol (**117a**)<sup>158</sup>

Utilizando 6.22 mmol (1.5 g) de **116a**, se obtienen 6.20 mmol (1.66 g) de un sólido amarillento, Rto: 99%, Pf: 90 - 93 °C.



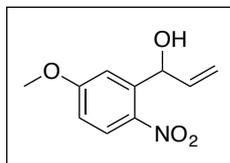
### 1-(5-Cloro-2-nitrofenil)prop-2-en-1-ol (**117b**)<sup>163</sup>

Utilizando 10.3 mmol (1.91 g) de 5-cloro-2-nitrobenzaldehído, se obtienen 9.68 mmol (2.05 g) de un sólido amarillento, Rto: 94%, Pf: 70 - 71°C.

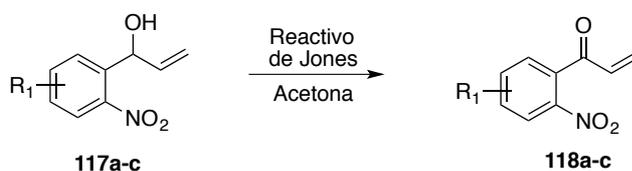


### 1-(5-Metoxi-2-nitrofenil)prop-2-en-1-ol (**117c**)<sup>163</sup>

Utilizando 10 mmol (1.81 g) de **116c**, se obtienen 9.8 mmol (2.05 g) de un sólido amarillo. Rto: 98%, Pf: 98 - 101 °C.



## Procedimiento general para la obtención de los derivados de 1-fenilprop-2-en-1-ona (**118a-c**)



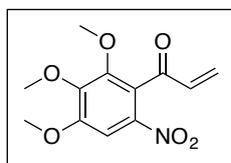
Para esta reacción es necesario preparar el reactivo de Jones: 133.5 mmol (13.35 g) de óxido de cromo (IV) se disuelven en 11.5 ml de ácido sulfúrico y se añade cantidad suficiente de agua destilada para alcanzar un volumen final de 50 ml.

Se diluyen en 20 ml de acetona 5 mmol del correspondiente 1-fenilprop-2-en-1-ol (**117a-c**), esta disolución se enfría hasta los 0 °C mediante un baño de hielo. A continuación, se adicionan 3 ml de reactivo de Jones y se deja agitando 20 min. Transcurrido este tiempo la reacción se neutraliza con 5 ml de NaHSO<sub>3</sub> y 5 ml de agua. Se procede a la extracción con AcOEt (3 x 20 ml), se reúnen las fases orgánicas, se lava con salmuera, se seca con

NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra al rotavapor. Purificación por columna cromatográfica de silicagel, mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:5).

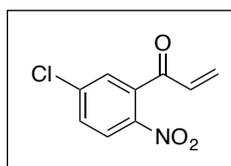
**1-(2,3,4-Trimetoxi-6-nitrofenil)prop-2-en-1-ona**  
**(118a)**<sup>162</sup>

Utilizando 5.4 mmol (1.45 g) de **117a**, se obtienen 3.94 mmol (1.05 g) de . Rto: 73%, Pf: 143 - 145 °C.



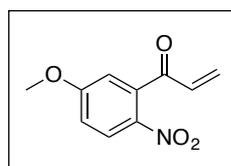
**1-(5-Cloro-2-nitrofenil)prop-2-en-1-ona**  
**(118b)**<sup>163</sup>

Utilizando 8.5 mmol (1.81 g) de **117b**, se obtienen 6.88 mmol (1.45 g) de . Rto: 81%, Pf: 94- 96 °C.

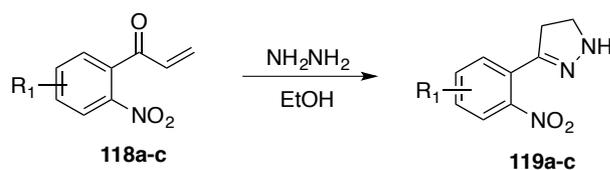


**1-(5-Metoxi-2-nitrofenil)prop-2-en-1-ona**  
**(118c)**<sup>163</sup>

Utilizando 8.8 mmol (1.84 g) de **117c**, se obtienen 6.95 mmol (1.43 g) de . Rto: 79%, Pf: 123 - 125 °C.

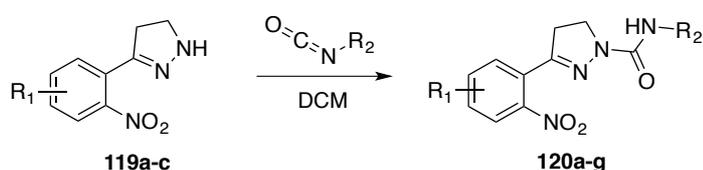


Procedimiento general para la obtención de los derivados de 3-(nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol (119a-c)



Se disuelven 2 mmol de la correspondiente cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (**118a-c**) en 10 ml de EtOH. A continuación, se añaden bajo agitación 3.4 mmol (261  $\mu$ l) de hidrazina monohidrato y se lleva a reflujo (85 °C) durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se concentra al rotavapor para eliminar el EtOH y se realiza una extracción con agua y éter dietílico (3 x 15 ml). Las fases orgánicas se reúnen, se seca con NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra al rotavapor. Estos derivados no se aíslan, directamente se utilizan en la siguiente reacción.

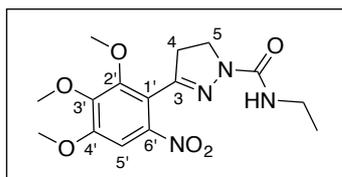
Procedimiento general para la obtención de los derivados de 3-(nitrofenil)-*N*-sustituídos-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamidas (120a-g)



Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar, se disuelve el crudo de la reacción anterior (**119a-c**) en 3 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro. A continuación, se añaden 2 mmol (279  $\mu$ l) de trietilamina y 3 mmol del correspondiente isocianato. La mezcla de reacción se irradia en microondas a 80 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo se concentra al rotavapor y se purifica directamente por columna cromatográfica de silicagel, mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:3).

***N*-Etil-3-(6-nitro-2,3,4-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (120a)**

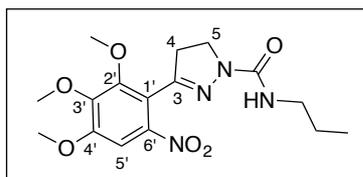
A partir de 2 mmol de **119a** y utilizando 3 mmol (237  $\mu$ l) de isocianato de etilo, se obtienen 1.34 mmol (472 mg) de un sólido amarillo. Rto: 67%. Pf: 126 - 128 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.40 (s, 1H, H-5'), 5.69 (sa, 1H, -CO-), 4.05 (t, 2H, H-5,  $J$  = 10.3 Hz), 3.98, 3.96, 3.89 (3s, 9H, 2'-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.30 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.18 (t, 2H, H-4,  $J$  = 10.3 Hz), 1.14 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J$  = 7.2 Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  155.25 (C-3), 153.7 (-CONH-), 152.4 (C-4'), 149.1 (C-3'), 146.5 (C-6'), 143.6 (C-2'), 116.6 (C-1'), 104.1 (C-5'), 62.0, 61.0 (2'-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>), 56.5 (4'-OCH<sub>3</sub>), 45.1 (C-5), 36.4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 34.7 (C-4), 15.3 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 353.1461, encontrado: 353.1456.

### 3-(6-Nitro-2,3,4-trimetoxifenil)-*N*-propil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (120b)

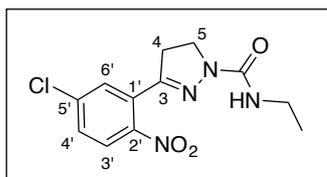
A partir de 2 mmol de **119a** y utilizando 3 mmol (281  $\mu$ l) de isocianato de propilo, se obtienen 1.38 mmol (506 mg) de un sólido amarillo. Rto: 69%. Pf: 132 - 135 °C.



$^1\text{H RMN}$  (400.17 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.39 (s, 1H, H-5'), 5.74 (sa, 1H, -CO-), 4.03 (t, H-5,  $J = 10.3$  Hz), 3.96, 3.95, 3.88 (3s, 9H, 2'-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.20 (t, H-4,  $J = 10.3$  Hz), 3.11 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.50 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.91 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.4$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  155.9 (C-3), 153.6 (-CONH-), 152.3 (C-4'), 149.4 (C-3'), 146.5 (C-6'), 143.6 (C-2'), 116.4 (C-1'), 104.1 (C-5'), 62.1, 61.1 (2'-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>), 56.8 (4'-OCH<sub>3</sub>), 44.9 (C-5), 41.8 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 36.2 (C-4); 23.2 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.2 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>: 389.1437, encontrado: 389.1436.

### 3-(5-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-etil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (120c)

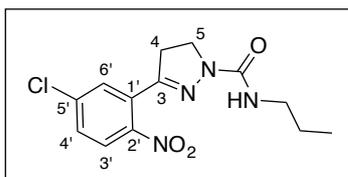
A partir de 2 mmol de **119b** y utilizando 3 mmol (237  $\mu$ l) de isocianato de etilo se obtienen 1.24 mmol (368 mg) de un sólido blanco. Rto: 62%. Pf: 123 - 125 °C.



$^1\text{H RMN}$  (400.17 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.78 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.6$  Hz), 7.51 (m, 2H, H-4', H-6'), 5.78 (sa, 1H, -CONH-), 4.05 (t, 2H, H-5,  $J_{5-4} = 10.2$  Hz), 3.34 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.12 (t, 2H, H-4,  $J_{4-5} = 10.2$  Hz), 1.19 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.2$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154.8 (-CONH-), 148.0 (C-3), 146.7 (C-2'), 138.7 (C-5'), 129.9, 129.8 (C-4', C-6'), 128.2 (C-1'), 125.5 (C-3'), 45.4 (C-5), 35.0 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 33.5 (C-4), 15.5 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 297.0754, encontrado 297.0757.

### 3-(5-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-propil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (120d)

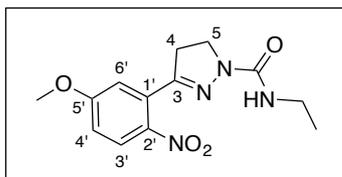
A partir de 2 mmol de **119b** y utilizando 3 mmol (281  $\mu$ l) de isocianato de propilo se obtienen 1.22 mmol (462 mg) de un sólido blanco. Rto: 61%. Pf: 110 - 112 °C.



**$^1\text{H RMN}$**  (300.20 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.69 (d, 1H, H-3',  $J = 8.6$  Hz), 7.43 (m, 2H, H-4', H-6'), 5.76 (sa, 1H, -CONH-), 3.98 (t, 2H, H-5,  $J = 10.4$  Hz), 3.19 (m, 2H, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.05 (t, 2H, H-4,  $J = 10.4$  Hz), 1.50 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.88 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.4$  Hz).  **$^{13}\text{C RMN}$**  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154.9 (-CONH-), 147.9 (C-3), 146.6 (C-2'), 138.7 (C-5'), 129.9, 129.8 (C-4', C-6'), 128.1 (C-1'), 125.5 (C-3'), 45.4 (C-5), 41.8 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 33.4 (C-4), 23.4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.3 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 311.0911, encontrado: 311.0917.

### *N*-Etil-3-(5-metoxi-2-nitrofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (120e)

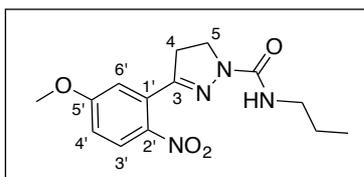
A partir de 2 mmol de **119c** y utilizando 3 mmol (237  $\mu$ l) de isocianato de etilo, se obtienen 1.78 mmol (520 mg) de un sólido amarillo. Rto: 89%. Pf: 128 - 130 °C.



**$^1\text{H RMN}$**  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.03 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.9$  Hz), 6.99 (dd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 8.9$  Hz,  $J_{4'-6'} = 2.7$  Hz), 6.97 (d, 1H, H-6',  $J_{6'-4'} = 2.7$  Hz), 5.81 (sa, 1H, -CONH-) 4.05 (t, 2H, H-5,  $J_{5-4} = 10.4$  Hz), 3.92 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.33 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.10 (t, 2H, H-4,  $J_{4-5} = 10.4$  Hz), 1.17 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.2$  Hz).  **$^{13}\text{C RMN}$**  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.2 (-CONH-), 155.5 (C-3), 151.4 (C-5'), 141.4 (C-2'), 130.5 (C-1'), 127.4 (C-3'), 115.8 (C-6'), 114.7 (C-4'), 56.3 (-OCH<sub>3</sub>), 45.5 (C-5), 35.1 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 34.9 (C-4), 15.7 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 293.1250, encontrado: 293.1232.

### 3-(5-Metoxi-2-nitrofenil)-*N*-propil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (120f)

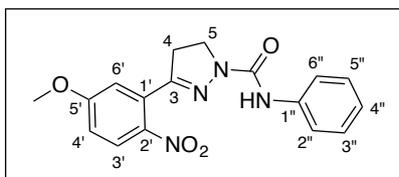
A partir de 2 mmol de **119c** y utilizando 3 mmol (281  $\mu$ l) de isocianato de propilo, se obtienen 1.44 mmol (441 mg) de un sólido amarillo. Rto: 72%. Pf: 89 - 92 °C.



$^1\text{H RMN}$  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.02 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.9$  Hz), 6.99 (dd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 9.0$  Hz,  $J_{4'-6'} = 2.7$  Hz), 6.97 (d, 1H, H-6',  $J_{6'-4'} = 2.7$  Hz), 5.86 (sa, 1H, -CONH-), 4.05 (t, 2H,  $J_{5-4} = 10.4$  Hz), 3.92 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.25 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.11 (t, 2H, H-4,  $J_{4-5} = 10.4$  Hz), 1.55 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.93 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.4$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.2 (-CONH-), 155.5 (C-3), 151.4 (C-5'), 141.4 (C-2'), 130.4 (C-1'), 127.3 (C-3'), 115.8 (C-6'), 114.7 (C-4'), 56.3 (-OCH<sub>3</sub>), 45.5 (C-5), 42.0 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 34.8 (C-4), 23.6 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.5 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 307.1406, encontrado: 307.1422.

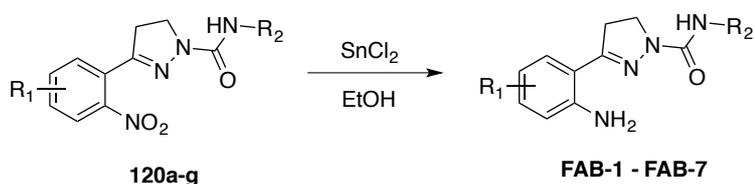
### *N*-Fenil-3-(5-metoxi-2-nitrofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (120g)

A partir de 2 mmol de **119c** y utilizando 3 mmol (326  $\mu$ l) de isocianato de fenilo, se obtienen 1.40 mmol (476 mg) de un sólido amarillo. Rto: 70%. Pf: 150 - 152 °C.



$^1\text{H RMN}$  (400.17 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.01 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.8$  Hz), 7.80 (s, 1H, -CONH-), 7.43 (d, 2H, H-2'', H-6'',  $J = 7.6$  Hz), 7.23 (m, 2H, H-3'', H-5''), 6.97 (m, 3H, H-4', H-6', H-4''), 4.08 (t, 2H, H-5,  $J_{5-4} = 10.3$  Hz), 3.88 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.13 (t, 2H, H-4,  $J_{4-5} = 10.3$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (100.73 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  163.3 (-CONH-), 152.6 (C-3), 152.3 (C-5'), 141.3 (C-2'), 138.5 (C-1''), 130.1 (C-1'), 129.1 (C-2'', C-6''), 127.5 (C-3'), 123.1 (C-4''), 119.1 (C-3'', C-5''), 116.0 (C-6'), 114.9 (C-4'), 56.3 (-OCH<sub>3</sub>), 45.2 (C-5), 35.2 (C-4). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 341.1250, encontrado: 341.1249.

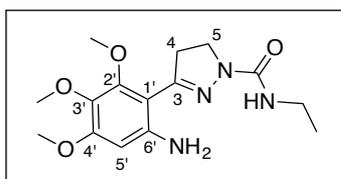
Procedimiento general para la obtención de los derivados de 3-(aminofenil)-*N*-sustituidos-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamidas (FAB-1 – FAB-7)



A una disolución de 0.4 mmol del correspondiente nitroareno (**120a-g**) en 10 ml de EtOH se le añaden 2 mmol (453mg) de cloruro de estaño (II). La mezcla resultante se lleva a reflujo durante 2 horas, transcurrido este tiempo, la reacción se neutraliza mediante la adición de 10 ml de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Se concentra al rotavapor para eliminar el exceso de EtOH y se procede a la extracción de la fase acuosa con AcOEt (3 x 15 ml), las fases orgánicas se secan con NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se concentran al rotavapor. Purificación por columna cromatográfica de silicagel, mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:10).

**3-(6-Amino-2,3,4-trimetoxifenil)-*N*-etil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (FAB-1)**

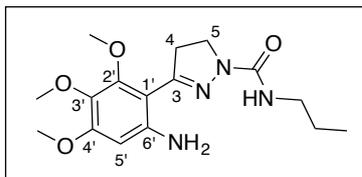
A partir de 0.4 mmol (141 mg) de **120a**, se obtienen 0.32 mmol (104 mg) de un sólido marrón. Rto: 80%, Pf: 150 - 153 °C.



<sup>1</sup>H RMN (400.17 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.06 (s, H-5'), 5.62 (sa, 3H, -NH<sub>2</sub>, -CONH-), 3.87 (m, 8H, H-5, 2'-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.35 (m, 4H, H-4, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.17 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, J = 7.2 Hz). <sup>13</sup>C RMN (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155.3, 155.1 (-CONH-, C-3), 154.0 (C-4'), 153.6 (C-2'), 142.9 (C-6'), 134.2 (C-3'), 102.8 (C-1'), 95.1 (C-5'), 61.2, 61.0 (2'-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (4'-OCH<sub>3</sub>), 43.6 (C-5), 36.4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 34.9 (C-4), 15.8 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). MS (LSIMS): m/z calculado para C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 323.1710, encontrado: 323.172.

### 3-(6-Amino-2,3,4-trimetoxifenil)-N-propil-4,5-dihidro-1H-pirazolo-1-carboxamida (FAB-2)

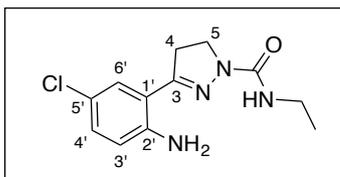
A partir de 0.4 mmol (146 mg) de **120b**, se obtienen 0.33 mmol (112 mg) de un sólido marrón. Rto: 83%, Pf: 156 - 158 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.17 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.06 (s, 1H, H-6'), 5.69 (sa, 3H, -NH<sub>2</sub>, -CONH-), 3.88 (m, 8H, H-5, 2'-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.35 (t, 2H, H-4, = 10.2 Hz), 3.26 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.55 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.93 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, *J* = 7.40 Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  155.4, 155.1 (-CONH-, C-3), 154.0 (C-4'), 153.6 (C-2'), 142.8 (C-6'), 134.3 (C-3'), 102.9 (C-1'), 95.2 (C-5'), 61.2, 61.0 (2'-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (4'-OCH<sub>3</sub>), 43.7 (C-5), 41.8 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 36.4 (C-4), 23.6 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.3 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 337.1876, encontrado: 337.1870.

### 3-(2-Amino-5-cloroxifenil)-N-etil-4,5-dihidro-1H-pirazolo-1-carboxamida (FAB-3)

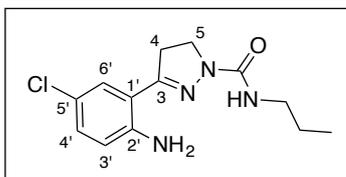
A partir de 0.4 mmol (118 mg) de **120c**, se obtienen 0.32 mmol (86 mg) de un sólido blanco. Rto: 81%, Pf: 215 - 217 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.17 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.14 (d, 1H, H-6', *J* = 2.4 Hz), 7.12 (dd, 1H, H-4', *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.4 Hz), 6.68 (d, 1H, H-3', *J* = 8.6 Hz), 5.54 (sa, 3H, -NH<sub>2</sub>, -CONH-), 3.96 (t, 2H, H-5, *J* = 10.2 Hz), 3.37 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.27 (t, 2H, H-4, *J* = 10.2 Hz), 1.20 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, *J* = 7.2 Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  154.6 (-CONH-), 153.3 (C-3), 144.4 (C-2'), 130.0 (C-4'), 128.3 (C-6'), 121.3 (C-5'), 116.9 (C-3'), 114.9 (C-1'), 43.1 (C-5), 34.8 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 33.3 (C-4), 15.5 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>4</sub>O [M + H]<sup>+</sup>: 267.1013, encontrado: 267.1021.

### 3-(2-Amino-5-clorofenil)-*N*-propil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (FAB-4)

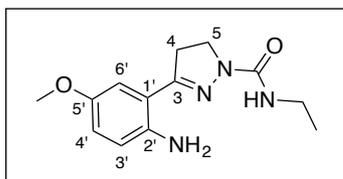
A partir de 0.4 mmol (124 mg) de **120d**, se obtienen 0.34 mmol (94 mg) de un sólido blanco. Rto: 84%, Pf: 212 - 214 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.17 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.15 (d, 1H, H-6', *J* = 2.3 Hz), 7.11 (dd, 1H, H-4', *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.3 Hz), 6.68 (d, 1H, H-3', *J* = 8.6 Hz), 5.59 (sa, 3H, -NH<sub>2</sub>, -CONH-), 3.95 (t, 2H, H-5, *J* = 10.4 Hz), 3.27 (m, 4H, H-4, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.59 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.95 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, *J* = 7.4 Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154.9 (-CONH-), 153.5 (C-3), 144.6 (C-2'), 130.8 (C-4'), 128.5 (C-6'), 121.6 (C-5'), 117.2 (C-3'), 115.2 (C-1'), 43.4 (C-5), 41.9 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 33.5 (C-4), 23.6 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.3 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>4</sub>O [M + H]<sup>+</sup>: 281.1169, encontrado: 281.1163.

### 3-(2-Amino-5-metoxifenil)-*N*-etil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (FAB-5)

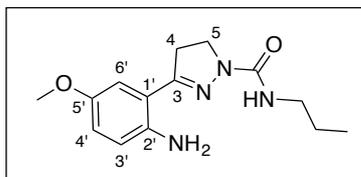
A partir de 0.4 mmol (117 mg) de **120e**, se obtienen 0.39 mmol (102mg) de un sólido blanco. Rto: 97%, Pf: 194 - 195 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.83 (dd, 1H, H-4', *J*<sub>4'-3'</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>4'-6'</sub> = 2.8 Hz), 6.74 (d, 1H, H-6', *J*<sub>6'-4'</sub> = 2.8 Hz), 6.71 (d, 1H, H-3', *J*<sub>3'-4'</sub> = 8.8 Hz), 5.62 (sa, 1H, -CONH-), 5.20 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.93 (t, 2H, H-5, *J*<sub>5-4</sub> = 10.1 Hz), 3.76 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.37 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.27 (t, 2H, H-4, *J*<sub>4-5</sub> = 10.1 Hz), 1.19 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, *J* = 7.2 Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155.1 (-CONH-), 154.5 (C-3), 151.5 (C-5'), 140.6 (C-2'), 117.4 (C-4'), 117.4 (C-3'), 114.9 (C-1'), 114.2 (C-6'), 56.1 (-OCH<sub>3</sub>), 43.4 (C-5), 35.2 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 33.9 (C-4), 15.9 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 263.1508, encontrado: 263.1490.

### 3-(2-Amino-5-metoxifenil)-*N*-propil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (FAB-6)

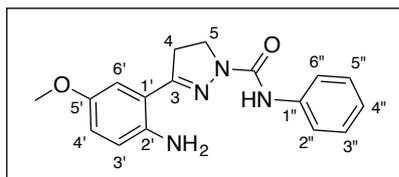
A partir de 0.4 mmol (123 mg) de **120f**, se obtienen 0.36 mmol (100 mg) de un sólido blanco. Rto: 91%, Pf: 187 - 190 °C.



$^1\text{H RMN}$  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.82 (dd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 8.8$  Hz,  $J_{4'-6'} = 2.8$  Hz), 6.74 (d, 1H, H-6',  $J_{6'-4'} = 2.8$  Hz), 6.71 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.8$  Hz), 5.66 (sa, 1H, -CONH-), 5.22 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.93 (t, 2H, H-5,  $J_{5-4} = 10.1$  Hz), 3.76 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.28 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, H-4), 1.57 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.94 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J_{3'-4'} = 7.4$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  155.2 (-CONH-), 154.4 (C-3), 151.5 (C-5'), 140.5 (C-2'), 117.4 (C-4'), 117.3 (C-3'), 115.0 (C-1'), 114.2 (C-6'), 56.1 (-OCH<sub>3</sub>), 43.5 (C-5), 42.0 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 33.9 (C-4), 23.8 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.5 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 277.1665, encontrado: 277.1675.

### 3-(2-Amino-5-metoxifenil)-*N*-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazolo-1-carboxamida (FAB-7)

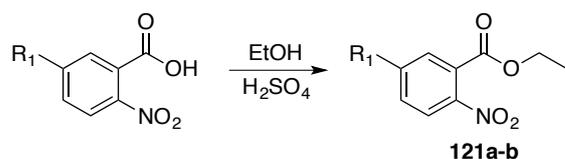
A partir de 0.4 mmol (136 mg) de **120g**, se obtienen 0.38 mmol (120 mg) de un sólido blanco. Rto: 96%, Pf: 168 - 170 °C.



$^1\text{H RMN}$  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.64 (s, 1H, -CONH-), 7.49 (dt, 2H, H-2'', H-6'',  $J_{2''-3''} = J_{6''-5''} = 8.1$  Hz,  $J_{2''-4''} = J_{6''-4''} = 1.1$  Hz), 7.31 (dd, 2H, H-3'', H-5'',  $J_{3''-2''} = J_{5''-6''} = 8.1$  Hz,  $J_{3''-4''} = J_{5''-4''} = 7.5$  Hz), 7.05 (tt, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = J_{4''-5''} = 7.5$  Hz,  $J_{4''-2''} = J_{4''-6''} = 1.1$  Hz), 6.87 (dd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 8.8$  Hz,  $J_{4'-6'} = 2.8$  Hz), 6.78 (d, 1H, H-6',  $J_{6'-4'} = 2.8$  Hz), 6.75 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.8$  Hz), 5.27 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>), 4.02 (t, 2H, H-5,  $J_{5-4} = 10.3$  Hz), 3.78 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.36 (t, 2H, H-4,  $J_{4-5} = 10.3$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  155.4 (-CONH-), 152.0 (C-3), 151.6 (C-5'), 140.6 (C-2'), 138.5 (C-1''), 129.1 (C-2'', C-6''), 123.3 (C-4''), 119.4 (C-3'', C-5''), 117.9 (C-4'), 117.6 (C-3'), 114.6 (C-1'), 114.3 (C-6'), 56.2 (-OCH<sub>3</sub>), 43.2 (C-5), 34.2 (C-4). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 311.1508, encontrado: 311.1516.

### 3.1.3. Síntesis de la Familia B

#### Procedimiento general para la obtención de los derivados de 2-nitrobenzoatos de etilo (121a-b)



Se disuelven 20 mmol del correspondiente derivado del ácido 2-nitrobenzoico en 25 ml de EtOH absoluto. A continuación, se añaden 1.5 ml de ácido sulfúrico y se calienta a reflujo durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se concentra al rotavapor para eliminar el disolvente orgánico. El residuo obtenido se somete a una extracción con una solución acuosa de NaOH al 10% (20 ml) y AcOEt (3 x 30 ml), se reúnen las fases orgánicas, se lavan con salmuera, se secan con NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se concentran al rotavapor.

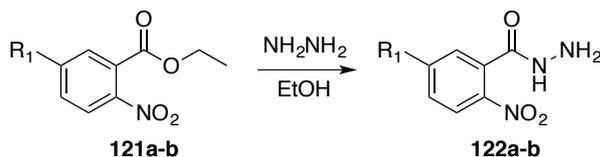
#### 2-Nitrobenzoato de etilo (121a)<sup>160</sup>

Partiendo de 20 mmol (3.34 g) de ácido 2-nitrobenzoico se obtienen 16.67 mmol (3.25 g) de un sirupo amarillo. Rto: 82 %

#### 5-Metoxi-2-nitrobenzoato de etilo (121b)<sup>160</sup>

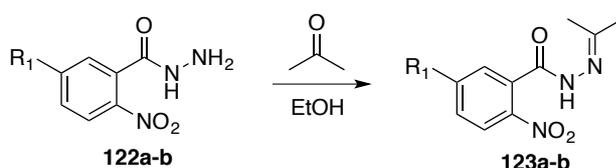
Partiendo de 20 mmol (3.94 g) de ácido 5-metoxi-2nitrobenzoico se obtienen 14.6 mmol (3.28 g) de un sirupo marrón. Rto: 73%

#### Procedimiento general para la obtención de los derivados de 2-nitrobenzohidrazida (122a-b)<sup>160</sup>



Se disuelven 15 mmol del correspondiente nitrobenzoato de etilo (**121a-b**) en 6 ml de EtOH y se añaden 72 mmol (3.5 ml) de hidrazina monohidrato. La mezcla se calienta hasta reflujo durante 5 horas. Transcurrido este tiempo se concentra al rotavapor conectado a una bomba de aceite para eliminar todo el disolvente. El resultado es un sirupo de color oscuro que se utiliza directamente en la siguiente reacción.

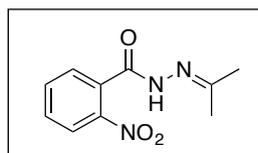
Procedimiento general para la obtención de los derivados de isopropiliden-2-nitrobenzohidrazida (123a-b)



Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar, se disuelve la correspondiente nitrobenzohidrazida (**122a-b**) en 10 ml de EtOH absoluto, para adicionar seguidamente 44 mmol (3.2 ml) de acetona anhidra. Se mantiene con fuerte agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, en el caso de aparecer un precipitado, se filtra a través de Buchner y Kitasato, si por el contrario, se mantiene como disolución se concentra al rotavapor para eliminar los disolventes orgánicos. El crudo obtenido se somete a una extracción con agua (20 ml) y DCM (3 x 30 ml), se reúnen las fases orgánicas, se lavan con salmuera, se secan con NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y se concentran al rotavapor. Purificación por columna cromatográfica de silicagel, mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:3).

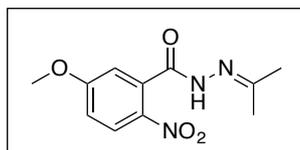
***N*'**-Isopropiliden-2-nitrobenzohidrazida (**123a**)<sup>160</sup>

Se obtienen 12.6 mmol (2.78 g) de un sólido amarillo. Rto: 84%. Pf: 207 - 209 °C.

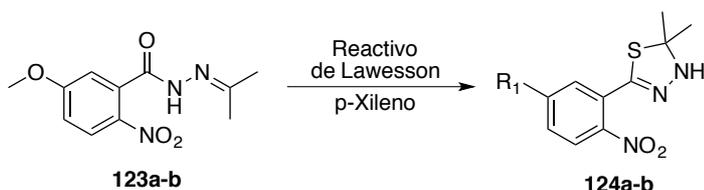


***N*'**-Isopropiliden-5-Metoxi-2-nitro-benzohidrazida (**123b**)<sup>160</sup>

Se obtienen 10.8 mmol (2.71 g) de un sólido amarillo. Rto: 72%. Pf: 215 - 218 °C.

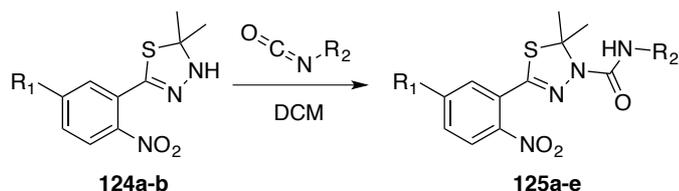


Procedimiento general para la obtención de los derivados de 2,2-dimetil-5-(2-nitrofenil)-2,3-dihidro-1,3,4-tiadiazol (124a-b)<sup>160</sup>



Se disuelven 2 mmol del correspondiente derivado de isopropiliden-2-nitrobenzohidrazida (**123a-b**) en 20 ml de *p*-xileno a los que, posteriormente, se añaden 1.25 mmol (505 mg) de reactivo de Lawesson. Esta mezcla se calienta hasta reflujo (140 °C), durante 5 horas. Transcurrido este tiempo se concentra al rotavapor conectado a una bomba de aceite para eliminar todos los disolventes. El crudo de reacción se utiliza directamente como producto de partida para la siguiente.

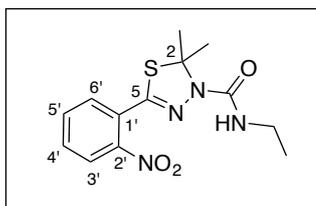
Procedimiento general para la obtención de los derivados *N*-sustituídos de 2,2-dimetil-5-(2-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazolo-3(2*H*)-carboxamida (125a-e)



Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar, se disuelve el crudo de la reacción anterior (**124a-b**) en 3 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro. A continuación, se añaden 2 mmol (279 μl) de trietilamina y 3 mmol del correspondiente isocianato. La mezcla de reacción se irradia en microondas a 80 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se concentra al rotavapor y se purifica directamente por columna cromatográfica de silicagel, mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:10).

**2,2-Dimetil-N-etil-5-(2-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazolo-3(2H)-carboxamida (125a)**

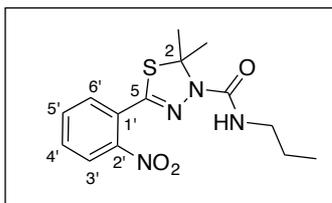
A partir de 2 mmol de **124a** y utilizando 3 mmol (237  $\mu$ l) de isocianato de etilo, se obtienen 1.32 mmol (407 mg) de un aceite amarillo. Rto: 66%.



**$^1\text{H RMN}$**  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.72 (dd, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 7.9$  Hz,  $J_{3'-5'} = 1.3$  Hz), 7.60 (ddd, 1H, H-5',  $J_{5'-4'} = 7.8$  Hz  $J_{5'-6'} = 7.6$  Hz,  $J_{5'-3'} = 1.3$  Hz), 7.55 (ddd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 7.9$  Hz,  $J_{4'-5'} = 7.8$  Hz,  $J_{4'-6'} = 1.6$  Hz), 7.52 (dd, H-6',  $J_{6'-5'} = 7.6$  Hz,  $J_{6'-4'} = 1.6$  Hz), 5.82 (sa, 1H, -CONH-), 3.26 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.07 (s, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>), 1.16 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.3$  Hz).  **$^{13}\text{C RMN}$**  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154.6 (-CONH-), 148.6 (C-2'), 140.1 (C-5), 132.1 (C-5'), 130.7, 130.6 (C-6', C-4'), 124.4 (C-1'), 123.9 (C-3'), 82.5 (C-2), 35.1 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 29.8 (2x-CH<sub>3</sub>), 15.3 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3\text{NaS}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>: 331.0841, encontrado: 331.0830.

**2,2-Dimetil-5-(2-nitrofenil)-N-propil-1,3,4-tiadiazolo-3(2H)-carboxamida (125b)**

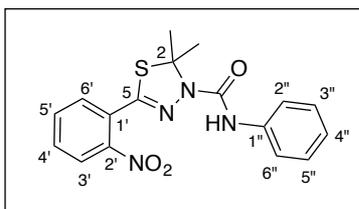
A partir de 2 mmol de **124a** y utilizando 3 mmol (281  $\mu$ l) de isocianato de propilo, se obtienen 1.20 mmol (387 mg) de un aceite amarillo. Rto: 60%.



**$^1\text{H RMN}$**  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.69 (dd, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 7.8$  Hz,  $J_{3'-5'} = 1.3$  Hz), 7.59 (ddd, 1H, H-5',  $J_{5'-4'} = 7.7$  Hz,  $J_{5'-6'} = 7.6$  Hz,  $J_{5'-3'} = 1.3$  Hz), 7.53 (ddd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 7.8$  Hz,  $J_{4'-5'} = 7.7$  Hz,  $J_{4'-6'} = 1.6$  Hz), 7.49 (dd, H-6',  $J_{6'-5'} = 7.6$  Hz,  $J_{6'-4'} = 1.5$  Hz), 5.88 (sa, 1H, -CONH-), 3.18 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>), 1.53 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.93 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.4$  Hz).  **$^{13}\text{C RMN}$**  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154.7 (-CONH-), 148.6 (C-2'), 139.9 (C-5), 132.0 (C-5'), 130.6 (C-6', C-4'), 124.2 (C-1'), 123.8 (C-3'), 82.5 (C-2), 42.0 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 29.8 (2x-CH<sub>3</sub>), 23.3 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>: 323.1178, encontrado: 323.1169.

### 2,2-Dimetil-N-fenil-5-(2-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazolo-3(2H)-carboxamida (125c)

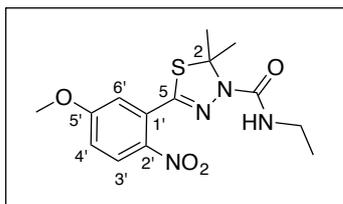
A partir de 2 mmol de **124a** y utilizando 3 mmol (326  $\mu$ l) de isocianato de fenilo, se obtienen 1.26 mmol (449 mg) de un sólido amarillo. Rto: 63%.



$^1\text{H RMN}$  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.91 (sa, 1H, -CONH-), 7.74 (dd, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 7.8$  Hz,  $J_{3'-5'} = 1.3$  Hz), 7.64 (ddd, 1H, H-5',  $J_{5'-4'} = 7.7$  Hz,  $J_{5'-6'} = 7.6$  Hz,  $J_{5'-3'} = 1.4$  Hz), 7.59 (ddd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 7.8$  Hz,  $J_{4'-5'} = 7.7$  Hz,  $J_{4'-6'} = 1.6$  Hz), 7.54 (dd, H-6',  $J_{6'-5'} = 7.6$  Hz,  $J_{6'-4'} = 1.5$  Hz), 7.49 (dd, 2H, H-2'', H-6'',  $J_{2''-3''} = J_{6''-5''} = 8.6$  Hz,  $J_{2''-4''} = J_{6''-4''} = 1.1$  Hz), 7.31 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7.06 (td, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = J_{4''-5''} = 7.4$  Hz,  $J_{4''-2''} = J_{4''-6''} = 1.1$  Hz), 2.11 (s, 6H, 2x- $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  151.7 (-CONH-), 148.6 (C-5), 141.0 (C-2'), 138.3 (C-1''), 132.1 (C-6'), 131.0 (C-5'), 130.6 (C-4'), 129.1 (C-3'', C-5''), 123.8 (C-4''), 123.7 (C-1'), 123.4 (C-3'), 119.4 (C-2'', C-6''), 82.4 (C-2), 29.8 (2x- $\text{CH}_3$ ). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3\text{NaS}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ : 379.0841, encontrado: 379.0837.

### 2,2-Dimetil-N-etil-5-(5-metoxi-2-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazolo-3(2H)-carboxamida (125d)

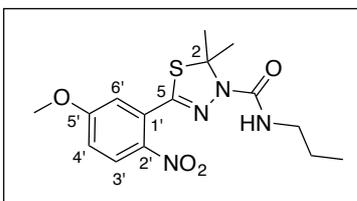
A partir de 2 mmol de **124b** y utilizando 3 mmol (237  $\mu$ l) de isocianato de etilo, se obtienen 1.24 mmol (476 mg) de un sólido blanco. Rto: 62%. Pf: 164 - 167  $^\circ\text{C}$ .



$^1\text{H RMN}$  (400.17 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.94 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.9$  Hz), 7.01 (d, 1H, H-4',  $J = 2.7$  Hz), 6.99 (s, 1H, H-6'), 5.88 (sa, 1H, -CONH-), 3.92 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 3.32 - 3.22 (m, 2H, - $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2.10 (s, 6H, 2x- $\text{CH}_3$ ), 1.16 (t, 3H, - $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ,  $J = 7.2$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  162.7 (C-5'), 154.8 (-CONH-), 141.7, 141.2 (C-2', C-5), 127.9 (C-1'), 127.1 (C-3'), 116.2 (C-6'), 115.3 (C-4'), 82.8 (C-2), 56.3 (- $\text{OCH}_3$ ), 35.1 (- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 29.7 (2x- $\text{CH}_3$ ), 15.4 (- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{NaS}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ : 361.0946, encontrado: 361.0954.

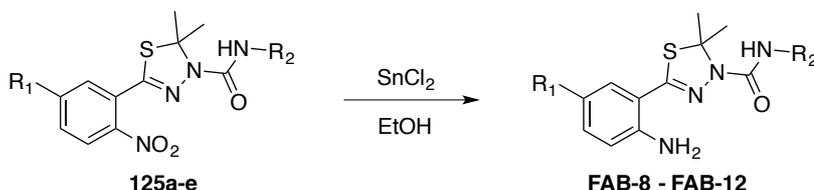
### 2,2-Dimetil-5-(5-metoxi-2-nitrofenil)-*N*-propil-1,3,4-tiadiazolo-3(2*H*)-carboxamida (125e)

A partir de 2 mmol de **124b** y utilizando 3 mmol (281  $\mu$ l) de isocianato de propilo, se obtienen 1.30 mmol (458 mg) de un aceite amarillo. Rto: 65%.



$^1\text{H RMN}$  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.91 (d, 1H, H-3',  $J = 9.0$  Hz), 7.00 (d, 1H, H-4',  $J_{4'-6'} = 2.8$  Hz), 6.98 (d, 1H, H-6',  $J_{6'-4'} = 2.9$  Hz), 5.93 (sa, 1H, -CONH-), 3.91 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.19 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.09 (s, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>), 1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.92 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.4$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  162.6 (C-5'), 154.9 (-CONH-), 141.7, 141.1 (C-2', C-5), 127.8 (C-1'), 126.9 (C-3'), 116.1 (C-6'), 115.3 (C-4'), 82.7 (C-2), 56.3 (-OCH<sub>3</sub>), 42.0 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 29.7 (2x-CH<sub>3</sub>), 23.4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.5 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 353.1284, encontrado: 353.1309.

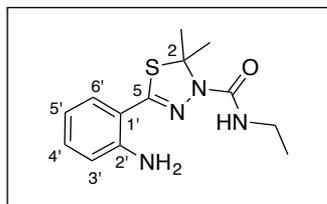
### Procedimiento general para la obtención de los derivados *N*-sustituidos de 5-(2-aminofenil)-2,2-dimetil-1,3,4-tiadiazolo-3(2*H*)-carboxamida (FAB-8 – FAB-12)



A una disolución de 0.4 mmol del correspondiente nitroareno (**125a-e**) en 10 ml de EtOH se le añaden 2 mmol (453mg) de cloruro de estaño (II). La mezcla resultante se lleva a reflujo durante 2 horas, transcurrido este tiempo, la reacción se neutraliza mediante la adición de 10 ml de una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Se concentra al rotavapor para eliminar el exceso de EtOH y se procede a la extracción de la fase acuosa con AcOEt (3 x 15 ml), las fases orgánicas se secan con  $\text{NaSO}_4$  anhidro, se filtran y se concentran al rotavapor. Purificación por columna cromatográfica de silicagel, mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:8).

5-(2-Aminofenil)-2,2-dimetil-N-etil-1,3,4-tiadiazolo-3(2H)-carboxamida (FAB-8)

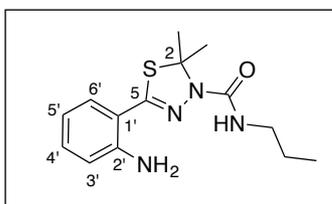
A partir de 0.4 mmol (123 mg) de **125a**, se obtienen 0.33 mmol (94 mg) de un sirupo marrón. Rto: 84%.



$^1\text{H RMN}$  (400.17 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.16 (m, 2H, H-6', H-4'), 6.71 (m, 2H, H-5', H-3'), 5.69 (sa, 1H, -CONH-), 4.90 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.31 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>), 1.16 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.3$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (100.73 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154.8 (-CONH-), 147.7 (C-2'), 145.2 (C-5), 131.0, 130.7 (C-6', C-4'), 117.6, 116.4 (C-5', C-3'), 113.5 (C-1'), 78.2 (C-2), 35.0 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 29.5 (2x-CH<sub>3</sub>), 15.6 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{ONaS}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>: 301.1099, encontrado: 301.1087.

5-(2-Aminofenil)-2,2-dimetil-N-propil-1,3,4-tiadiazolo-3(2H)-carboxamida (FAB-9).

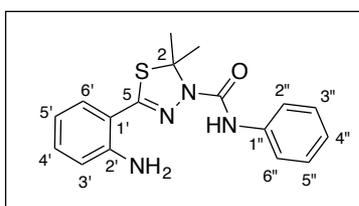
A partir de 0.4 mmol (129 mg) de **125b**, se obtienen 0.37 mmol (108 mg) de un sirupo marrón. Rto: 93%.



$^1\text{H RMN}$  (499.79 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.17 (m, 2H, H-6', H-4'), 6.72 (m, 2H, H-5', H-3'), 5.77 (sa, 1H, -CONH-), 5.16 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.24 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>), 1.56 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.94 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.4$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154.9 (-CONH-), 147.7 (C-2'), 145.3 (C-5), 131.0, 130.7 (C-4', C-6'), 117.6, 116.3 (C-5', C-3'), 113.5 (C-1'), 78.2 (C-2), 42.0 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 29.5 (2x-CH<sub>3</sub>), 23.5 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.5 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{OS}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>: 293.1436, encontrado: 293.1440.

5-(2-Aminofenil)-2,2-dimetil-N-fenil-1,3,4-tiadiazolo-3(2H)-carboxamida (FAB-10)

A partir de 0.4 mmol (142 mg) de **125c**, se obtienen 0.35 mmol (114 mg) de un sólido blanco. Rto: 87%, Pf: 113 - 116 °C.

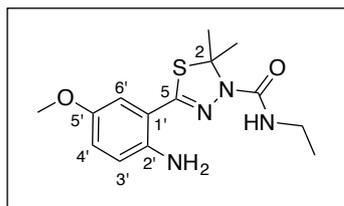


$^1\text{H RMN}$  (400.17 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.79 (s, 1H, -CONH-), 7.49 (d, 2H, H-2'', H-6'',  $J_{2''}$ ).

$3'' = J_{6''-5''} = 8.6$  Hz), 7.36 (dd, 2H, H-3'', H-5'',  $J_{3''-2''} = J_{5''-6''} = 8.6$  Hz,  $J_{3''-4''} = J_{5''-4''} = 7.4$  Hz), 7.27 (m, 2H, H-6', H-4'), 7.12 (t, H-4'',  $J_{4''-5''} = J_{4''-3''} = 7.4$  Hz), 6.80 (m, 2H, H-5', H-3'), 5.30 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.15 (s, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C RMN** (100.73 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  151.9 (-CONH-), 148.9 (C-2'), 145.3 (C-5), 138.2 (C-1''), 131.4, 130.8 (C-4', C-6'), 129.1 (C-2'', C-6''), 123.6 (C-4''), 119.8 (C-3'', C-5''), 117.8, 116.5 (C-3', C-5'), 113.3 (C-1'), 78.2 (C-2), 29.6 (2x-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>OS [M + H]<sup>+</sup>: 327.1280, encontrado: 327.1269.

#### 5-(2-Amino-5-metoxifenil)-2,2-dimetil-*N*-etil-1,3,4-tiadiazolo-3(2*H*)-carboxamida (FAB-11)

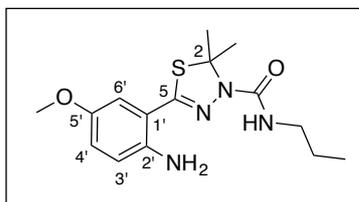
A partir de 0.4 mmol (135 mg) de **125d**, se obtienen 0.28 mmol (86 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 70%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.82 (dd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 8.8$  Hz,  $J_{4'-6'} = 2.7$  Hz), 6.72 (d, 1H, H-6',  $J_{6'-4'} = 2.7$  Hz), 6.70 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.8$  Hz), 5.74 (sa, 1H, -CONH-), 5.22 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.32 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 1.17 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.2$  Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  154.8 (-CONH-), 151.7 (C-5), 147.2 (C-5'), 139.4 (C-2'), 118.5 (C-4'), 117.9 (C-3'), 114.4 (C-1'), 114.1 (C-6'), 78.5 (C-2), 56.4 (-OCH<sub>3</sub>), 35.2 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 29.6 (2x-CH<sub>3</sub>), 15.6 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S [M + H]<sup>+</sup>: 309.1385, encontrado: 309.1382.

#### 5-(2-Amino-5-metoxifenil)-2,2-dimetil-*N*-propil-1,3,4-tiadiazolo-3(2*H*)-carboxamida (FAB-12)

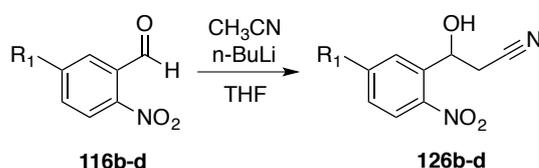
A partir de 0.4 mmol (141 mg) de **125e**, se obtienen 0.27 mmol (88 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 68%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.83 (dd, 1H, H-4',  $J_{4'-3'} = 8.8$  Hz,  $J_{4'-6'} = 2.8$  Hz), 6.73 (d, 1H, H-6',  $J_{6'-4'} = 2.8$  Hz), 6.70 (d, 1H, H-3',  $J_{3'-4'} = 8.8$  Hz), 5.80 (sa, 1H, -CONH-), 5.25 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.24 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 1.56 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.94 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  $J = 7.4$  Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  155.1 (-CONH-), 152.0 (C-5), 147.4 (C-5'), 139.7 (C-2'), 118.8 (C-4'), 118.2 (C-3'), 114.7 (C-1'), 114.4 (C-6'), 78.8 (C-2), 56.3 (-OCH<sub>3</sub>), 42.3 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 29.8 (2x-CH<sub>3</sub>), 23.8 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 11.7 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S [M + H]<sup>+</sup>: 323.1542, encontrado: 323.1563.

### 3.1.4. Síntesis de la Familia C

#### Procedimiento general para la obtención de los derivados de 3-hidroxi-3-fenilpropanonitrilo (126b-d)



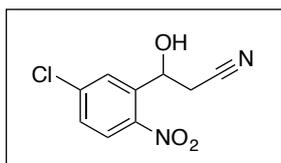
La noche anterior a la reacción se debe anhidrificar un matraz de 3 bocas, un embudo de adición y un fijador de termómetros, todos sin las partes de plástico. Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar, realizamos el siguiente montaje: Una boca para termómetro de baja temperatura, otra boca para el embudo de adición y la última para el septum con entrada de Ar.

En el matraz se introducen 20 ml (2/3 del volumen total) de THF anhidro y se reduce la temperatura hasta - 78 °C usando un baño de hielo seco y acetona. Seguidamente, se adicionan 20 mmol (12.5 ml) de butil-litio 1.6 M en hexano y, gota a gota, adicionamos 30 mmol (1.572 ml) de acetonitrilo. Se agita durante 1 hora, hasta que la disolución toma un ligero color salmón. Transcurrido este tiempo, se procede a disolver 10 mmol del derivado de 2-nitrobenzaldehído correspondiente, **116b-d**, con 10 ml de THF en el propio embudo de adición. A continuación, esta disolución se hace gotear sobre la reacción, vigilando que la temperatura no suba de - 60 °C. Una vez completado este proceso se deja agitando otros 30 minutos a - 78 °C, se retira el baño y se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente.

La reacción se neutraliza mediante la adición de 25 ml de H<sub>2</sub>O fría, seguidamente se concentra al rotavapor. El crudo resultante se extrae en con AcOEt (3 x 30 ml) añadiendo una solución de HCl al 2% para observar la separación de fases. Las fases orgánicas se lavan con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. Por último, se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra al rotavapor. Purificación por cromatografía en columna (AcOEt.Hex) (1:4).

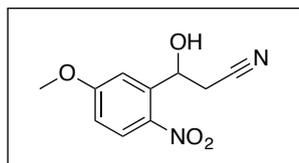
### 3-(5-Cloro-2-nitrofenil)-3-hidroxi-propanonitrilo (**126b**)<sup>157</sup>

Utilizando 10 mmol (1.85 g) de **116b**, se obtienen 7.09 mmol (1.60 g) de un sólido marrón. Rto: 71%. Pf: 63 - 64 °C.



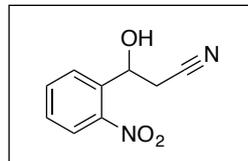
### 3-Hidroxi-3-(5-metoxi-2-nitrofenil)propanonitrilo (**126c**)<sup>157</sup>

Utilizando 10 mmol (1.81 g) de **116c**, se obtienen 8.62 mmol (1.91 g) de un sólido naranja. Rto: 86%. Pf: 88 - 90 °C.

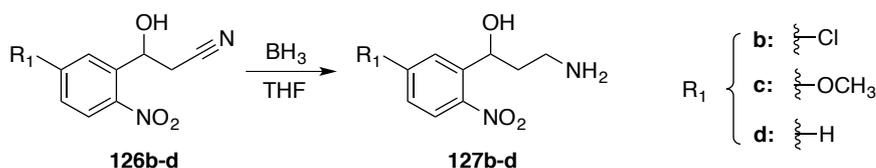


### 3-Hidroxi-3-(2-nitrofenil)propanonitrilo (**126d**)<sup>164</sup>

Utilizando 10 mmol (1.51 g) de **116d**, se obtienen 9.29 mmol (1.78 g) de un sólido naranja. Rto: 93%. Pf: 82 - 85 °C.



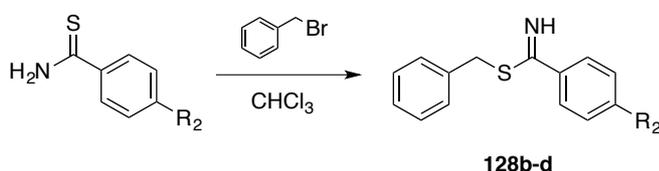
### Procedimiento general para la obtención de los derivados de 3-amino-1-(2-nitro-5-sustituido-fenil)propan-1-ol (**127b-d**)



Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar y a 0 °C por baño de hielo, se añaden 10 ml de BH<sub>3</sub> 1 M en THF sobre 2 mmol los derivados **126b-d**. Tras 5 horas de agitación a temperatura ambiente, se vuelve a bajar la temperatura a 0 °C, para añadir cuidadosamente 10 ml de una solución de HCl 6 N muy fría. A continuación, la reacción se concentra al rotavapor para eliminar los disolventes orgánicos, la solución acuosa resultante tiene un marcado carácter ácido, por lo que se neutraliza con una solución de NaOH 10 M hasta alcanzar un pH = 8 - 9. Se procede a extraer con AcOEt (3 x 15 ml), se reúnen las fases orgánicas, se lava con salmuera, se seca con NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra al rotavapor. El crudo resultante se somete a una percolación en silicagel, mezcla de

eluyentes (DCM:MeOH) (8:2) saturado con NH<sub>4</sub>OH. Por último, se elimina el DCM al rotavapor y el producto disuelto en MeOH se utiliza directamente en la siguiente reacción.

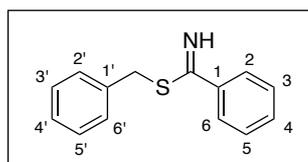
Procedimiento general para la obtención de los derivados de benzimidotioato de bencilo (128b-d)



Se disuelven 5 mmol de la correspondiente benzotioamida de origen comercial en 15 ml de CHCl<sub>3</sub>, a continuación, se añaden 5.5 mmol (634 μl) de bromuro de bencilo y se calienta a reflujo durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, el matraz se enfría hasta temperatura ambiente y sumerge en un baño de hielo, esto produce la aparición de un precipitado blanco que aumenta durante las siguientes 12 horas. Se separa dicho sólido gracias a una placa filtrante y un matraz Kitasato.

**Hidrobromuro de benzimidotioato de bencilo (128b)**<sup>165</sup>

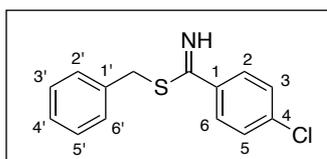
Utilizando 5 mmol (0.69 g) de benzotioamida, se obtienen 4.7 mmol (1.45 g) de un sólido blanco. Rto: 94%. Pf: 194 - 196 °C.



<sup>1</sup>H-RMN (300.20 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.11 – 8.03 (m, 2H, H-2, H-6), 7.94 – 7.80 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 7.68 (t, 2H, H-2', H-6', J = 7.8 Hz), 7.56 (t, 1H, H-4', J = 7.2 Hz) 7.48 (t, 2H, H-3', H-5', J = 7.3 Hz), 4.41 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-). **MS (LSIMS):** m/z calculado para C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N [M+H]<sup>+</sup>: 228.0841, encontrado 228.0845.

**Hidrobromuro de 4-clorobenzimidotioato de bencilo (128c)**<sup>166</sup>

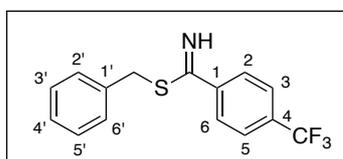
Utilizando 5 mmol (0.86 g) de 4-clorobenzotioamida, se obtienen 4.5 mmol (1.54 g) de un sólido blanco. Rto: 90 %. Pf: 182 - 184 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (300.20 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.93 (d, 2H, H-2, H-6, *J*<sub>2-3</sub> = *J*<sub>6-5</sub> = 8.5 Hz), 7.72 (d, 2H, H-3, H-5, *J*<sub>3-2</sub> = *J*<sub>5-6</sub> = 8.5 Hz), 7.53 (d, 2H, H-2', H-6', *J* = 6.8 Hz), 7.48 – 7.33 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 4.77 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NSCl [M+H]<sup>+</sup>: 262.0457, encontrado 262.0459.

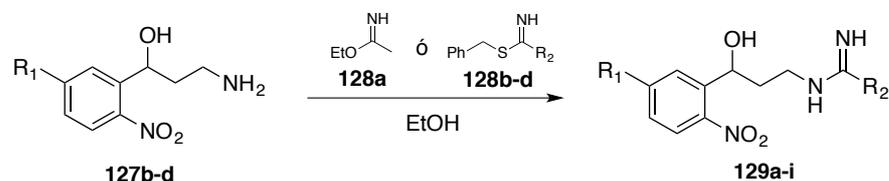
### Hidrobromuro de 4-(trifluorometil)benzimidotioato de bencilo (128d)

Utilizando 5 mmol (1.02 g) de 4-(trifluorometil)benzotioamida, se obtienen 3.95 mmol (1.48 g) de un sólido blanco. Rto: 79%. Pf: 147 - 150 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (300.20 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.02 (sa, 1H, C=NH), 8.08 (d, 2H, H-2, H-6, *J*<sub>2-3</sub> = *J*<sub>6-5</sub> = 7.7 Hz), 8.00 (d, 2H, H-3, H-5, *J*<sub>3-2</sub> = *J*<sub>5-6</sub> = 7.7 Hz), 7.53 (d, 2H, H-2', H-6', *J* = 7.0 Hz), 7.39 (p, 3H, H-3', H-5', H-4', *J* = 7.5 Hz), 4.75 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-). **<sup>13</sup>C NMR** (100.70 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.68 (C=NH), 137.32 (C-1'), 135.01 (C-1), 132.72 (C-4), 129.39 (C-2, C-6), 128.41 (C-3', C-5'), 128.34 (C-2', C-6'), 127.31 (C-4'), 125.26 (q, C-3, C-4, *J* = 3.4 Hz), 123.40 (q, CF<sub>3</sub>, *J* = 272.4 Hz), 41.58 (-CH<sub>2</sub>-). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NSF<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 296.0721, encontrado: 296.0733.

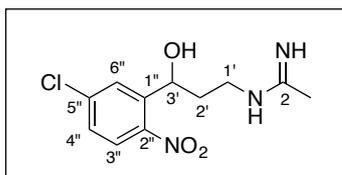
### Procedimiento general para la obtención de los derivados de *N*-(3-hidroxi-3-(2-nitro-5-sustituidofenil)propil)imidamidas (129a-i)



Sobre una solución de 2 mmol de cada una de las aminas **127b-d** en 10 ml MeOH, enfriada a 0 °C mediante baño de hielo, se añaden 3 mmol de los diferentes imidatos **128a-d**. Se mantiene agitando la mezcla de reacción durante 15 horas a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se concentra a rotavapor para eliminar los disolventes orgánicos. El crudo resultante se somete a purificación por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (9:1) saturando con NH<sub>4</sub>OH.

### N-(3-(5-Cloro-2-nitrofenil)-3-hidroxi-propil)acetimidamida (129a)

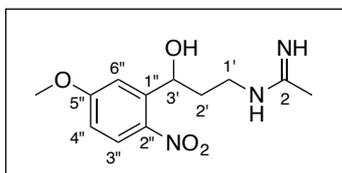
A partir de 2 mmol de **127b** y 3 mmol (368 mg) de **128a** se obtienen 0.8 mmol (1.91 g) de un sirupo naranja. Rto: 40%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.00 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.7$  Hz), 7.91 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.3$  Hz), 7.51 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.7$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.3$  Hz), 5.27 (dd, 1H, H-3',  $J = 9.5$  Hz,  $J = 2.3$  Hz), 3.60 – 3.45 (m, 2H, H-1'), 2.41 – 2.29 (m, 1H, H-2'b), 2.26 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.91 – 1.78 (m, 1H, H-2'b). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  166.20 (C-2), 146.99 (C-1''), 144.35 (C-2''), 141.08 (C-5''), 129.51, 129.18, 127.46 (C-3'', C-4'', C-6''), 67.24 (C-3'), 40.55 (C-1'), 37.15 (C-2'), 19.04 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Cl [M + H]<sup>+</sup>: 272.0796, encontrado: 272.0789.

### N-(3-Hidroxi-3-(5-metoxi-2-nitrofenil)propil)acetimidamida (129b)

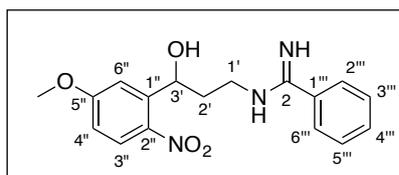
A partir de 2 mmol de **127c** y 3 mmol (368 mg) de **128a** se obtienen 0.96 mmol (257 mg) de un sirupo marrón. Rto: 48%.



**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.08 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.1$  Hz), 7.44 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.7$  Hz), 7.00 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.1$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.7$  Hz), 5.42 (dd, 1H, H-3',  $J = 9.3$  Hz,  $J = 2.0$  Hz), 3.93 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.60 – 3.50 (m, 2H, H-1'), 2.28 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.21 – 2.08 (m, 1H, H-2'b), 1.90 – 1.76 (m, 1H, H-2'a). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 166.14 (C-2), 165.50 (C-5''), 145.66 (C-1''), 141.24 (C-2''), 128.65 (C-3''), 114.16 (C-4''), 113.65 (C-6''), 67.68 (C-3'), 56.59 (-O-CH<sub>3</sub>), 40.71 (C-1'), 37.29 (C-2'), 19.07 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 268.1297, encontrado: 268.1292.

### N-(3-Hidroxi-3-(5-metoxi-2-nitrofenil)propil)benzimidamida (129c)

A partir de 2 mmol de **127c** y 3 mmol (924 mg) de **128b** se obtienen 1.48 mmol (487 mg) de un sirupo marrón. Rto: 74%.

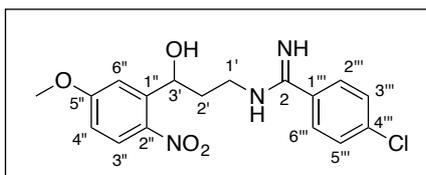


**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.14 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.1$  Hz), 7.88 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J = 7.3$  Hz), 7.78 (t,

1H, H-4'''  $J = 7.5$  Hz), 7.68 (t, 2H, H-3''', H-5''',  $J = 7.8$  Hz), 7.53 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.8$  Hz), 7.05 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.1$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.8$  Hz), 5.59 (dd, 1H, H-3',  $J = 9.4$  Hz,  $J = 2.1$  Hz), 3.98 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.93 – 3.87 (m, 1H, H-1'a), 3.83 – 3.77 (m, 1H, H-1'b), 2.39 – 2.31 (m, 1H, H-2'a), 2.06 – 1.98 (m, 1H, H-2'b). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  165.84 (C-2), 165.51 (C-5''), 145.67 (C-1''), 141.13 (C-2''), 134.61 (C-1'''), 130.57 (C-3''), 130.36 (C-2'''), C-6'''), 128.96 (C-3''', C-5'''), 128.70 (C-4'''), 114.21 (C-4''), 113.70 (C-6''), 67.80 (C-3'), 56.66 (-O-CH<sub>3</sub>), 41.43 (C-1'), 37.24 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 330.1454, encontrado: 330.1449.

#### 4-Cloro-N-(3-hidroxi-3-(5-metoxi-2-nitrofenil)propil)benzimidamida (129d)

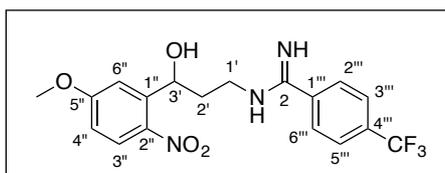
A partir de 2 mmol de **127c** y 3 mmol (1.02 g) de **128c** se obtienen 1.32 mmol (480 mg) de un sirupo naranja. Rto: 66%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.14 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.1$  Hz), 7.85 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 8.7$  Hz), 7.68 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.7$  Hz), 7.51 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.8$  Hz), 7.04 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.1$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.8$  Hz), 5.55 (dd, 1H, H-3',  $J_{3'-2'a} = 10.4$  Hz,  $J_{3'-2'b} = 2.1$  Hz), 3.97 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.92 – 3.82 (m, 1H, H-1'a), 3.79 – 3.72 (m, 1H, H-1'b Hz), 2.37 – 2.27 (m, 1H, H-2'b), 2.04 – 1.94 (m, 1H, H-2'a). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  165.58 (C-2), 165.02 (C-5''), 145.74 (C-1''), 141.21 (C-2''), 140.76 (C-4'''), 130.78 (C-2'''), C-6'''), 130.57 (C-3''', C-5'''), 129.27 (C-1'''), 128.73 (C-3''), 114.21 (C-4''), 113.71 (C-6''), 67.79 (C-3'), 56.62 (-O-CH<sub>3</sub>), 41.50 (C-1'), 37.22 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Cl [M + H]<sup>+</sup>: 364.1059, encontrado: 364.1051.

#### N-(3-Hidroxi-3-(5-metoxi-2-nitrofenil)propil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (129e)

A partir de 2 mmol de **127c** y 3 mmol (1.13 g) de **128d** se obtienen 0.92 mmol (365 mg) de un sirupo naranja. Rto: 46%.

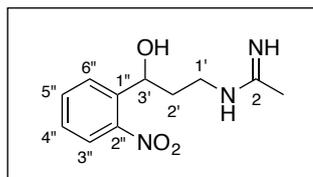


**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.14 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.1$  Hz), 8.02 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 8.3$  Hz), 7.97 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.3$  Hz), 7.51 (d, 1H, H-6'',

$J_{6''-4''} = 2.8$  Hz), 7.04 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.1$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.8$  Hz), 5.54 (dd, 1H, H-3',  $J = 9.4$  Hz,  $J = 2.1$  Hz), 3.97 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.91 – 3.84 (m, 1H, H-1'a), 3.79 – 3.73 (m, 1H, H-1'b), 2.36 – 2.28 (m, 1H, H-2'a), 2.01 – 1.94 (m, 1H, H-2'b). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  165.66 (C-2), 165.07 (C-5''), 145.80 (C-1''), 141.29 (C-2''), 135.75 (q, C-4''',  $J = 33.0$  Hz), 134.56 (d, C-1''',  $J = 1.2$  Hz), 130.09 (C-2''', C-6'''), 128.78 (C-3''), 127.28 (q, C-3''', C-5''',  $J = 3.8$  Hz), 124.92 (q, CF<sub>3</sub>,  $J = 272.1$  Hz), 114.20 (C-4''), 113.74 (C-6''), 67.80 (C-3'), 56.59 (-O-CH<sub>3</sub>), 41.60 (C-1'), 37.20 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>F<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 392.1328, encontrado: 398.1332.

#### N-(3-Hidroxi-3-(2-nitrofenil)propil)acetimidamida (129f)

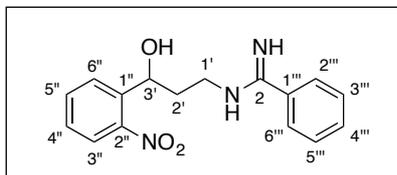
A partir de 2 mmol de **127d** y 3 mmol (368 mg) de **128a** se obtienen 1.76 mmol (417 mg) de un sirupo naranja. Rto: 88%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.90 (dd, 2H, H-6'', H-3'',  $J_{6''-5''} = J_{3''-4''} = 7.5$  Hz,  $J = 4.7$  Hz), 7.71 (t, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = J_{4''-5''} = 7.5$  Hz), 7.48 (t, 1H, H-5'',  $J_{5''-4''} = J_{5''-6''} = 7.5$  Hz), 5.24 (d, 1H, H-3',  $J = 9.2$  Hz), 3.60 – 3.42 (m, 2H, H-1'), 2.26 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.19 – 2.07 (m, 1H, H-2'b), 1.95 – 1.84 (m, 1H, H-2'a). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  166.08 (C-2), 148.74 (C-1''), 141.51 (C-2''), 134.70 (C-4''), 129.40, 129.11 (C-5'', C-6''), 125.22 (C-3''), 67.34 (C-3'), 40.75 (C-1'), 37.29 (C-2'), 19.08 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 238.1192, encontrado: 238.1178.

#### N-(3-Hidroxi-3-(2-nitrofenil)propil)benzimidamida (129g)

A partir de 2 mmol de **127d** y 3 mmol (924 mg) de **128b** se obtienen 1.42 mmol (426 mg) de un sirupo marrón. Rto: 71%.

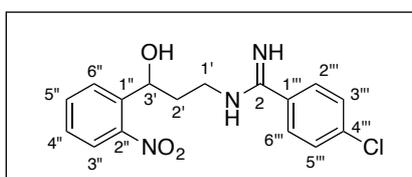


**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.77 (sa, 1H, H-1), 9.48, 9.05 (sa, 1H, H-3) 7.91 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 8.3$  Hz,  $J = 1.1$  Hz), 7.87 (dd, 1H, H-3'',  $J = 7.9$  Hz,  $J_{3''-5''} = 1.3$  Hz), 7.81 – 7.67 (m, 4H, H-4''', H-2''', H-6''', H-4''), 7.61 (t, 2H, H-3''', H-5''',  $J = 7.6$  Hz), 7.53 (dt, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 8.3$  Hz,  $J_{5''-3''} = 1.3$  Hz), 5.78 (d, 1H, -OH,  $J = 4.5$  Hz), 5.14 (m, 1H, H-3'), 3.68 – 3.55 (m, 2H, H-1'), 2.15 – 2.04 (m, 1H, H-2'a), 1.98 – 1.87 (m, 1H, H-2'b). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163.17 (C-2), 147.36 (C-1''), 140.19 (C-2''), 133.49 (C-4''), 133.22 (C-4'''), 129.14 (C-1'''), 128.88 (C-2''', C-6'''), 128.34, 128.22 (C-5'', C-6''), 128.15 (C-3''', C-5'''), 123.89 (C-3''),

65.40 (C-3'), 36.02 (C-1'), 30.70 (C-2'). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 300.1348, encontrado: 300.1343.

#### 4-Cloro-N-(3-hidroxi-3-(2-nitrofenil)propil)benzimidamida (129h)

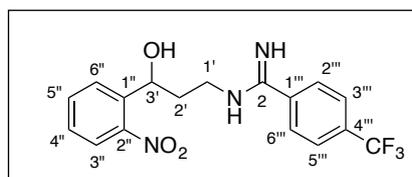
A partir de 2 mmol de **127d** y 3 mmol (1.02 g) de **128c** se obtienen 0.96 mmol (320 mg) de un sirupo naranja. Rto: 48%.



<sup>1</sup>H RMN (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.02 (ddd, 2H, H-3'', H-6'', *J* = 8.2 Hz, *J* = 2.9 Hz, *J*<sub>6''-4''</sub> = 1.2 Hz), 7.87 (d, 2H, H-2''', H-6''', *J*<sub>2'''-3'''</sub> = *J*<sub>6'''-5'''</sub> = 8.7 Hz), 7.82 (dt, 1H, H-4'', *J*<sub>4''-3''</sub> = *J*<sub>4''-5''</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>4''-6''</sub> = 1.2 Hz), 7.71 (d, 2H, H-3''', H-5''', *J*<sub>3'''-2'''</sub> = *J*<sub>5'''-6'''</sub> = 8.7 Hz), 7.58 (dt, 1H, H-5'', *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.5 Hz), 5.42 (dd, 1H, H-3', *J* = 9.6 Hz, *J* = 2.4 Hz), 3.90 - 3.84 (m, 1H, H-1a), 3.80 - 3.75 (m, 1H, H-1b), 2.38 - 2.31 (m, 1H, H-2b), 2.12 - 2.05 (m, 1H, H-2a). <sup>13</sup>C RMN (125.69 MHz CD<sub>3</sub>OD) δ 165.01 (C-2), 148.81 (C-1''), 141.67 (C-4'''), 140.74 (C-2''), 134.81 (C-4''), 130.83, 130.80 (C-2''', C-6'''), 130.58 (C-3''', C-5'''), 129.50, 129.19 (C-5'', C-6''), 129.23 (C-1'''), 125.30 (C-3''), 67.50 (C-3'), 41.50 (C-1'), 37.29 (C-2'). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Cl [M + H]<sup>+</sup>: 334.0958, encontrado: 334.0987.

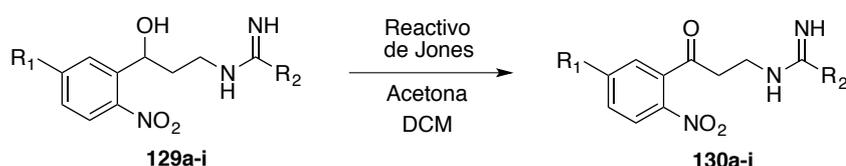
#### N-(3-hidroxi-3-(2-nitrofenil)propil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (129i)

A partir de 2 mmol de **127d** y 3 mmol (1.13 g) de **128d** se obtienen 1.92 mmol (704 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 96%.



<sup>1</sup>H RMN (400.45 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.98 (sa, 1H, H-1), 9.60, 9.35 (sa, 1H, H-3), 7.98 (dd, 4H, H-3''', H-5''', H-2''', H-6''', *J* = 26.1z Hz, *J* = 8.3 Hz), 7.91 (d, 1H, H-6'', *J* = 8.4 Hz), 7.86 (d, 1H, H-3'', *J*<sub>3''-4''</sub> = 7.5 Hz), 7.76 (t, 1H, H-4'', *J*<sub>4''-3''</sub> = *J*<sub>4''-5''</sub> = 7.5 Hz), 7.52 (t, 1H, H-5'', *J*<sub>5''-4''</sub> = 7.5 Hz), 5.82 (sa, 1H, -OH), 5.13 (dd, 1H, H-3', *J* = 9.2 Hz, *J* = 2.1 Hz), 3.62 (m, 2H, H-1'), 2.15 - 2.05 (m, 1H, H-2'b), 1.99 - 1.88 (m, 2H, H-2'a). <sup>13</sup>C RMN (100.70 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.20 (C-2), 147.36 (C-1''), 140.19 (C-2''), 133.52 (C-4''), 133.14 (d, C-1''', *J* = 1.0 Hz), 132.72 (q, C-4''', *J* = 32.5 Hz), 129.40 (C-2''', C-6'''), 128.37, 128.22 (C-5'', C-6''), 125.77 (q, C-3''', C-5''', *J* = 3.7 Hz), 123.92 (C-3''), 123.56 (q, CF<sub>3</sub>, *J* = 272.8 Hz), 65.45 (C-3'), 40.02 (C-1'), 35.94 (C-2'). **MS (LSIMS):** *m/z* calculado para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 368.1222, encontrado: 368.1218.

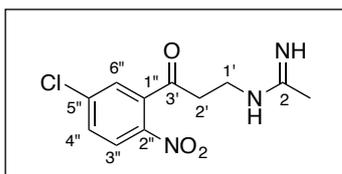
### Procedimiento general para la obtención de los derivados de *N*-(3-(2-nitro-5-sustituidofenil)-3-oxopropil)imidamidas (130a-i)



Sobre una disolución de 1.5 mmol del correspondiente **129a-i** en 15 ml de acetona y 15 ml de DCM, enfriada a 0 °C mediante baño de hielo, se hacen gotear 8 ml de reactivo de Jones. Tras 20 minutos de agitación, se adicionan 10 ml de MeOH para frenar la reacción; tras 10 minutos en reposo se procede a eliminar el precipitado verde (correspondiente a las sales de Cr) mediante filtración. El líquido resultante se concentra al rotavapor y se purifica por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (10:1), saturando con NH<sub>4</sub>OH.

#### *N*-(3-(5-Cloro-2-nitrofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (130a)

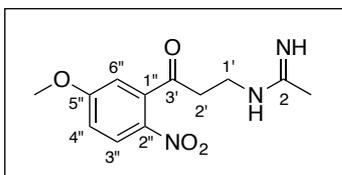
A partir de 1.5 mmol (407 mg) de **129a** se obtienen 0.6 mmol (162 mg) de un sólido rojo-anaranjado. Rto: 40%. Pf: 153 - 155 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.23 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.6$  Hz), 7.79 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.6$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.2$  Hz), 7.77 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.2$  Hz), 3.76 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 5.8$  Hz), 3.31 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'} = 5.8$  Hz), 2.31 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  198.31 (C-3'), 164.88 (C-2), 143.97 (C-2''), 140.62 (C-5''), 138.12 (C-1''), 130.85 (C-4''), 127.40 (C-6''), 126.04 (C-3''), 39.84 (C-1'), 36.36 (C-2'), 17.65 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Cl [M + H]<sup>+</sup>: 270.0645, encontrado: 270.0629.

#### *N*-(3-(5-Metoxi-2-nitrofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (130b)

A partir de 1.5 mmol (400 mg) de **129b** se obtienen 1.24 mmol (330 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 83%.

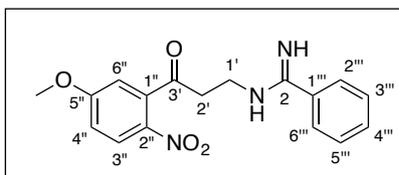


**<sup>1</sup>H RMN** (500.13 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.22 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.2$  Hz), 7.20 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.2$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.7$  Hz),

7.11 (d, 1H, H-6'',  $J_{4''-6''} = 2.7$  Hz), 3.98 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.75 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 6.0$  Hz), 3.24 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'} = 6.0$  Hz), 2.29 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C RMN** (125.77 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  201.20 (C-3'), 166.27 (C-2), 166.16 (C-5''), 141.22 (C-2''), 139.28 (C-1''), 128.32 (C-3''), 116.51 (C-4''), 113.57 (C-6''), 57.21 (-OCH<sub>3</sub>), 41.44 (C-1'), 37.92 (C-2'), 19.06 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 266.1141, encontrado: 266.1147.

#### N-(3-(5-Metoxi-2-nitrofenil)-3-oxopropil)benzimidamida (130c)

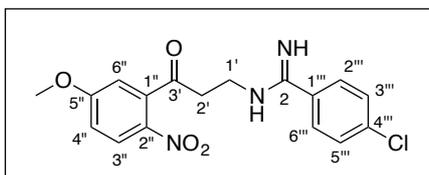
A partir de 1.5 mmol (493 mg) de **129c** se obtienen 0.96 mmol (314 mg) de un sirupo marrón. Rto: 64%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.23 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.1$  Hz), 7.83 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J = 7.6$  Hz), 7.76 (t, 1H, H-4''',  $J = 7.3$  Hz), 7.64 (t, 2H, H-3''', H-5''',  $J = 7.5$  Hz), 7.21 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.1$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.0$  Hz), 7.13 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.0$  Hz), 3.98 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.43 - 3.29 (m, 4H, H-1', H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  201.35 (C-3'), 168.49 (C-2), 166.16 (C-5''), 140.82 (C-2''), 139.18 (C-1''), 135.22 (C-4'''), 128.90 (C-2''', C-6'''), 128.85 (C-1'''), 128.62 (C-3''', C-5'''), 128.29 (C-3''), 116.71 (C-4''), 113.52 (C-6''), 57.30 (-O-CH<sub>3</sub>), 45.93 (C-1'), 35.80 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 328.1297, encontrado: 328.1293.

#### 4-Cloro-N-(3-(5-metoxi-2-nitrofenil)-3-oxopropil)benzimidamida (130d)

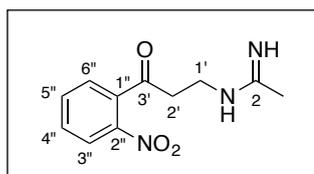
A partir de 1.5 mmol (544 mg) de **129d** se obtienen 0.99 mmol (357 mg) de un sirupo marrón. Rto: 66%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.26 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.2$  Hz), 7.82 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 8.5$  Hz), 7.67 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.5$  Hz), 7.24 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.2$ ,  $J_{4''-6''} = 2.7$  Hz), 7.16 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.7$  Hz), 4.01 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.97 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 5.6$  Hz), 3.38 - 3.32 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  201.28 (C-3'), 166.19 (C-2), 165.15 (C-5''), 141.19 (C-2''), 140.79 (C-1''), 139.30 (C-4'''), 130.83 (C-2''', C-6'''), 130.75 (C-3''', C-5'''), 129.32 (C-1'''), 128.36 (C-3''), 116.51 (C-4''), 113.64 (C-6''), 57.21 (-OCH<sub>3</sub>), 47.94 (C-1'), 38.60 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Cl [M + H]<sup>+</sup>: 362.0908, encontrado: 362.0919.

#### N-(3-(2-Nitrofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (130f)

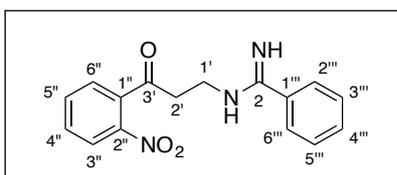
A partir de 1.5 mmol (355 mg) de **129f** se obtienen 0.84 mmol (197 mg) de un sirupo naranja. Rto: 56%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.16 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.2$  Hz), 7.87 (dd, 1H, H-5'',  $J_{5''-4''} = 7.8$  Hz,  $J_{5''-6''} = 7.3$  Hz), 7.76 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.2$  Hz,  $J_{4''-5''} = 7.8$  Hz), 7.70 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 7.3$  Hz), 3.74 (t, 2H, H-1',  $J = 5.9$  Hz), 3.31-3.25 (m, 2H, H-2'), 2.28 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  201.04 (C-3'), 166.23 (C-2), 147.16 (C-2''), 137.68 (C-1''), 135.62 (C-5''), 132.48 (C-4''), 128.84 (C-6''), 125.52 (C-3''), 41.14 (C-1'), 37.94 (C-2'), 19.05 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 236.1035, encontrado: 236.1043.

#### N-(3-(2-Nitrofenil)-3-oxopropil)benzimidamida (130g)

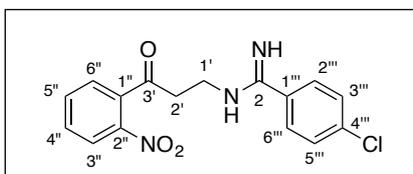
A partir de 1.5 mmol (455 mg) de **129g** se obtienen 1.32 mmol (392 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 88%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.22 (dd, 1H, H-3'',  $J = 8.2$  Hz,  $J = 0.8$  Hz), 7.91 (dt, 1H, H-5'',  $J = 7.6$  Hz,  $J = 3.8$  Hz), 7.85 – 7.79 (m, 3H, H-4'', H-2''', H-6'''), 7.79 – 7.73 (m, 2H, H-4''', H-6''), 7.71 – 7.63 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 4.03-3.95 (m, 2H, H-1'), 3.50-3.32 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  201.25 (C-3'), 166.11 (C-2), 147.24 (C-2''), 137.76 (C-1''), 135.69 (C-5''), 134.63 (C-4'''), 132.53 (C-4''), 130.70 (C-1'''), 130.35 (C-2''', C-6'''), 129.02 (C-3''', C-5'''), 128.89 (C-6''), 125.60 (C-3''), 38.58 (C-1'), 37.57 (C-2'). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 298.1192, encontrado: 298.1187.

#### 4-Cloro-N-(3-(2-nitrofenil)-3-oxopropil)benzimidamida (130h)

A partir de 1.5 mmol (499 mg) de **129h** se obtienen 0.67 mmol (223 mg) de un sólido blanco. Rto: 45%. Pf: 177 - 179 °C.

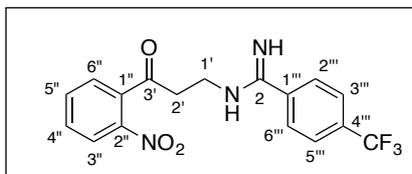


**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.20 (dd, 1H, H-3'',  $J = 8.2$  Hz,  $J_{3''-5''} = 0.9$  Hz), 7.90 (td, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 7.6$

Hz,  $J_{5''-3''} = 0.9$  Hz), 7.82 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 8.6$  Hz), 7.67 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.6$  Hz), 7.42 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 7.6$  Hz,  $J = 1.5$  Hz), 7.31 – 7.27 (m, 1H, H-4''), 3.96 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 5.8$  Hz), 3.44 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'} = 5.8$  Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  201.17 (C-3'), 165.02 (C-2), 147.17 (C-2''), 140.75 (C-4'''), 137.69 (C-1''), 135.68 (C-5''), 132.50 (C-4''), 130.82 (C-2''', C-6'''), 130.53 (C-3''', C-5'''), 129.19 (C-1'''), 128.91 (C-6''), 125.56 (C-3''), 41.17 (C-1'), 38.72 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Cl [M + H]<sup>+</sup>: 332.0802, encontrado: 332.0791.

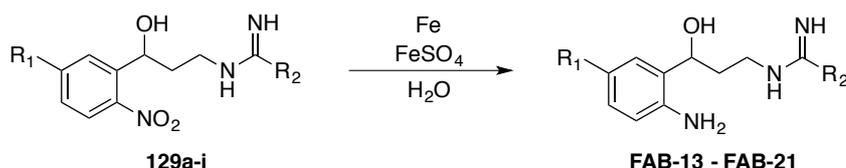
#### *N*-(3-(2-Nitrofenil)-3-oxopropil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (130i)

A partir de 1.5 mmol (550 mg) de **129i** se obtienen 0.91 mmol (334 mg) de un sirupor naranja. Rto: 61%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.21 (d, 1H, H-3'',  $J = 8.2$  Hz), 7.98 (q, 4H, H-2''', H-6''', H-3''', H-5''',  $J = 8.7$  Hz), 7.90 (t, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 7.5$  Hz), 7.79 (t, 1H, H-4'',  $J = 7.8$  Hz), 7.71 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 7.5$  Hz), 3.98 (m, 2H, H-1'), 3.35 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  201.20 (C-3'), 165.08 (C-2), 147.19 (C-2''), 137.74 (C-1''), 135.74 (C-5''), 135.71 (q, C-4''',  $J = 32.9$  Hz), 134.47 (C-1'''), 132.54 (C-4''), 130.13 (C-2''', C-6'''), 128.89 (C-6''), 127.22 (q, C-3''', C-5''',  $J = 3.5$  Hz), 125.61 (C-3''), 124.90 (q, CF<sub>3</sub>,  $J = 271.8$  Hz), 43.92 (C-1'), 38.73 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 366.1066, encontrado: 366.1082.

#### Procedimiento general para la obtención de los derivados de *N*-(3-(2-amino-5-sustituidofenil)-3-hidroxiopropil)imidamidas (FAB-13 – FAB-21)

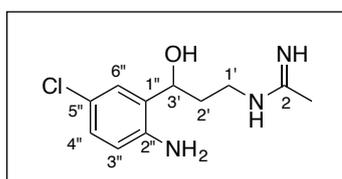


Se disuelve 1 mmol del correspondiente **129a-i** en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada, a continuación, se añaden 10 mmol (558 mg) de Fe en polvo y 1 mmol (278 mg) de sulfato de hierro. Se calienta la mezcla de reacción a reflujo durante 1.5 horas. Para finalizar la reacción, se deja alcanzar la

temperatura ambiente y se filtran los residuos insolubles a través de zeolita en una placa filtrante y un kitasato. La disolución acuosa resultante se concentra al rotavapor conectado a una bomba de aceite y se purifica por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (8:1) saturando con NH<sub>4</sub>OH.

### *N*-(3-(2-Amino-5-clorofenil)-3-hidroxiopropil)acetimidamida (FAB-13)

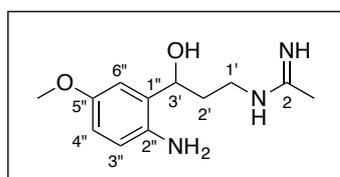
A partir de 1 mmol (271 mg) de **129a** se obtienen 0.42 mmol (103 mg) de un sirupo naranja. Rto: 42%.



<sup>1</sup>H RMN (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.06 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.5$  Hz), 6.89 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.5$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.5$  Hz), 6.61 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.5$  Hz), 4.73 (t, 1H, H-3',  $J_{3'-2'} = 7.0$  Hz), 3.41 – 3.24 (m, 2H, H-1'), 2.14 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.03 – 1.95 (m, 2H, H-2'). <sup>13</sup>C RMN (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  166.04 (C-2), 145.08 (C-2''), 130.81 (C-1''), 128.75 (C-4''), 127.46 (C-6''), 123.30 (C-5''), 118.90 (C-3''), 69.82 (C-3'), 40.82 (C-1'), 34.38 (C-2'), 19.03 (-CH<sub>3</sub>). MS (LSIMS): *m/z* calculado para C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OCl [M + H]<sup>+</sup>: 242.1060, encontrado: 242.1055.

### *N*-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-hidroxiopropil)acetimidamida (FAB-14)

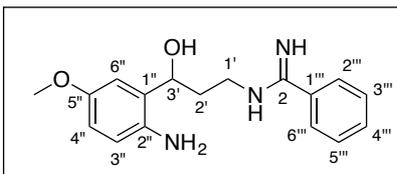
A partir de 1 mmol (267 mg) de **129b** se obtienen 0.3 mmol (71 mg) de un sirupo rojizo. Rto: 30%.



<sup>1</sup>H RMN (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  6.81 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.8$  Hz), 6.79 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.7$  Hz), 6.70 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.7$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.8$  Hz), 4.96 (d, 1H, H-3',  $J = 3.4$  Hz), 3.71 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.41 – 3.33 (m, 2H, H-1'), 2.19 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.12 – 2.04 (m, 2H, H-2'). <sup>13</sup>C RMN (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  166.07 (C-2), 155.42 (C-5''), 136.55 (C-2''), 132.46 (C-1''), 120.65 (C-3''), 114.80 (C-4''), 113.89 (C-6''), 70.57 (C-3'), 56.14 (-O-CH<sub>3</sub>), 40.83 (C-1'), 35.01 (C-2'), 18.95 (-CH<sub>3</sub>). MS (LSIMS): *m/z* calculado para C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 238.1556, encontrado: 238.1555.

**N-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-hidroxiopropil)benzimidamida (FAB-15)**

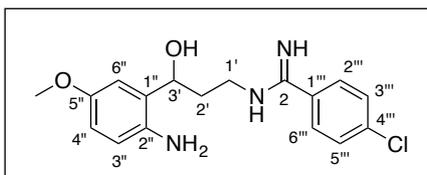
A partir de 1 mmol (329 mg) de **129c** se obtienen 0.47 mmol (142 mg) de un sirupo marrón. Rto: 47%.



$^1\text{H RMN}$  (499.79 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.77 – 7.72 (m, 3H, H-4''', H-2''', H-6'''), 7.62 (t, 2H, H-3''', H-5''',  $J = 7.8$  Hz), 6.88 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.8$  Hz), 6.78 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.6$  Hz), 6.71 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.6$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.8$  Hz), 4.95 (dd, 1H, H-3',  $J = 8.0$  Hz,  $J = 5.3$  Hz), 3.74 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.65 (t, 2H, H-1',  $J = 7.0$  Hz), 2.30 – 2.23 (m, 2H, H-2').  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  165.71 (C-2), 154.55 (C-5''), 138.64 (C-2''), 134.61 (C-4'''), 131.41 (C-1''), 130.56 (C-1'''), 130.36 (C-2''', C-6'''), 128.90 (C-3''', C-5'''), 119.78 (C-3''), 114.81 (C-4''), 113.73 (C-6''), 70.80 (C-3'), 56.13 (-O-CH<sub>3</sub>), 41.71 (C-1'), 34.71 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$  [M + H]<sup>+</sup>: 300.1712, encontrado: 300.1730.

**N-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-hidroxiopropil)-4-clorobenzimidamida (FAB-16)**

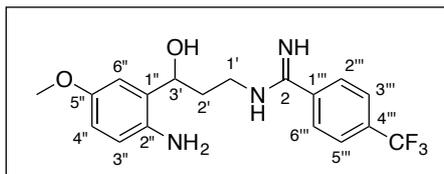
A partir de 1 mmol (363 mg) de **129d** se obtienen 0.63 mmol (210 mg) de un sirupo marrón. Rto: 63%.



$^1\text{H RMN}$  (499.79 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.74 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 8.6$  Hz), 7.65 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.6$  Hz), 6.88 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.8$  Hz), 6.77 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.6$  Hz), 6.71 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.6$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.8$  Hz), 4.95 (dd, 1H, H-3',  $J = 7.8$  Hz, 5.4 Hz), 3.75 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.65 (t, 2H, H-1',  $J = 6.9$  Hz), 2.32 – 2.22 (m, 2H, H-2').  $^{13}\text{C RMN}$  (125.69 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  164.75 (C-2), 154.44 (C-5''), 140.74 (C-4'''), 138.87 (C-2''), 131.27 (C-1''), 130.74 (C-2''', C-6'''), 130.53 (C-3''', C-5'''), 129.14 (C-1'''), 119.67 (C-3''), 114.80 (C-4''), 113.73 (C-6''), 70.74 (C-3'), 56.13 (-O-CH<sub>3</sub>), 41.79 (C-1'), 34.64 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2\text{Cl}$  [M + H]<sup>+</sup>: 334.1322, encontrado: 334.1313.

**N-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-hidroxiopropil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (FAB-17)**

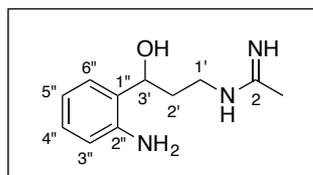
A partir de 1 mmol (397 mg) de **129e** se obtienen 0.44 mmol (162 mg) de un sirupo marrón. Rto: 44%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.96 – 7.91 (m, 4H, H-3''', H-5''', H-2''', H-6'''), 6.89 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.9$  Hz), 6.78 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.6$  Hz), 6.72 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.6$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.9$  Hz), 4.95 (dd, 1H, H-3',  $J = 8.0$  Hz,  $J = 5.3$  Hz), 3.75 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.67 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 6.9$  Hz), 2.32 – 2.24 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  164.73 (C-2), 154.58 (C-5''), 138.67 (C-2''), 135.70 (q, C-4''',  $J = 33.0$  Hz), 134.37 (C-1'''), 131.40 (C-1''), 130.08 (C-2''', C-6'''), 127.21 (q, C-3''', C-5''',  $J = 3.7$  Hz), 124.90 (q, CF<sub>3</sub>,  $J = 272.4$  Hz), 119.79 (C-3''), 114.81 (C-4''), 113.80 (C-6''), 70.81 (C-3'), 56.13 (-O-CH<sub>3</sub>), 41.89 (C-1'), 34.61 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 368.1586, encontrado: 368.1573.

**N-(3-(2-Aminofenil)-3-hidroxiopropil)acetimidamida (FAB-18)**

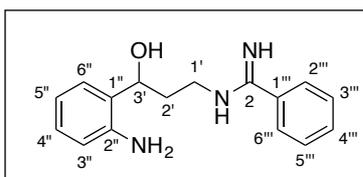
A partir de 1 mmol (237 mg) de **129f** se obtienen 0.45 mmol (93 mg) de un sirupo naranja. Rto: 45%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.14 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 7.9$  Hz,  $J_{6''-4''} = 1.1$ Hz), 7.03 (dt, 1H, H-4'',  $J_{4''-5''} = J_{4''-3''} = 7.9$  Hz,  $J_{4''-6''} = 1.1$ Hz), 6.74 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 7.9$  Hz), 6.69 (dt, 1H, H-5'',  $J_{5''-4''} = J_{5''-6''} = 7.9$  Hz,  $J = 0.8$  Hz), 4.64 – 4.59 (m, 1H, H-3'), 3.47 – 3.32 (m, 2H, H-1'), 2.22 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.20 – 2.05 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  166.02 (C-2), 146.12 (C-2''), 129.25 (C-4''), 129.12 (C-6''), 128.01 (C-1''), 119.27 (C-5''), 118.07 (C-3''), 70.82 (C-3'), 40.94 (C-1'), 34.49 (C-2'), 18.99 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O [M + H]<sup>+</sup>: 208.1450, encontrado: 208.1435.

### N-(3-(2-Aminofenil)-3-hidroxiopropil)benzimidamida (FAB-19)

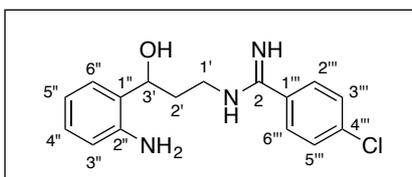
A partir de 1 mmol (299 mg) de **129g** se obtienen 0.71 mmol (191 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 71%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.75 – 7.72 (m, 1H, H-4'''), 7.71 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 7.8$  Hz), 7.60 (t, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = J_{3'''-4'''} = J_{5'''-4'''} = 7.8$  Hz), 7.18 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 7.4$  Hz), 7.05 (td, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.0$ , 1.5 Hz), 6.76 (dd, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.0$  Hz,  $J_{3''-5''} = 1.0$  Hz), 6.71 (td, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 7.4$  Hz,  $J_{5''-3''} = 1.0$  Hz), 4.91 (dd, 1H, H-3',  $J = 8.4$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 3.74 – 3.60 (m, 2H, H-1'), 2.35 – 2.17 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  165.79 (C-2), 146.19 (C-2''), 134.62 (C-4'''), 130.38 (C-2''', C-6'''), 129.34 (C-4''), 129.14 (C-1'''), 128.90 (C-3''', C-5'''), 128.61 (C-1''), 128.07 (C-6''), 119.36 (C-5''), 118.14 (C-3''), 71.44 (C-3'), 41.79 (C-1'), 34.36 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O [M + H]<sup>+</sup>: 270.1606, encontrado: 270.1597.

### N-(3-(2-Aminofenil)-3-hidroxiopropil)-4-clorobenzimidamida (FAB-20)

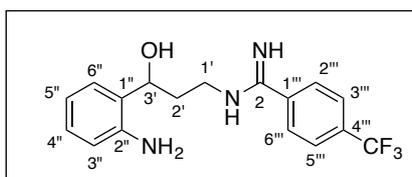
A partir de 1 mmol (333 mg) de **129h** se obtienen 0.66 mmol (200 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 66%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.70 (dt, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 8.7$  Hz,  $J_{2'''-6'''} = J_{6'''-2'''} = 2.1$  Hz), 7.64 (dt, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.7$  Hz,  $J_{3'''-5'''} = J_{5'''-3'''} = 2.4$  Hz), 7.18 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 7.4$  Hz,  $J_{6''-4''} = 1.4$  Hz), 7.06 (td, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 7.8$  Hz,  $J_{4''-6''} = 1.4$  Hz), 6.77 (dd, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 7.8$  Hz,  $J_{3''-5''} = 1.1$  Hz), 6.72 (td, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 7.4$  Hz,  $J_{5''-3''} = 1.1$  Hz), 4.93 – 4.89 (m, 1H, H-3'), 3.61 (t, 2H, H-1'  $J = 7.0$  Hz), 2.36 – 2.20 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  164.89 (C-2), 146.34 (C-2''), 140.82 (C-4'''), 130.69 (C-2''', C-6'''), 130.56 (C-3''', C-5'''), 129.38 (C-4''), 129.24 (C-1'''), 129.03 (C-1''), 128.09 (C-6''), 119.30 (C-5''), 118.11 (C-3''), 71.53 (C-3'), 41.84 (C-1'), 34.24 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>OCl [M + H]<sup>+</sup>: 304.1217, encontrado: 304.1189.

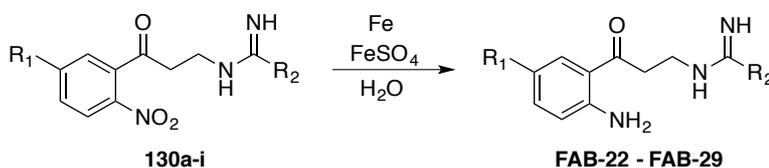
***N*-(3-(2-Aminofenil)-3-hidroxiopropil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (FAB-21)**

A partir de 1 mmol (367 mg) de **129i** se obtienen 0.39 mmol (131 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 39%.



<sup>1</sup>H RMN (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.94 – 7.88 (m, 4H, H-2''', H-3''', H-5''', H-6'''), 7.19 (dd, 1H, H-6'', J<sub>6''-5''</sub> = 7.5 Hz, J<sub>6''-4''</sub> = 1.5 Hz), 7.04 (td, 1H, H-4'', J<sub>4''-3''</sub> = 7.9 Hz, J<sub>4''-6''</sub> = 1.5 Hz), 6.76 (dd, 1H, H-3'', J<sub>3''-4''</sub> = 7.9 Hz, J<sub>3''-5''</sub> = 1.1 Hz), 6.71 (td, 1H, H-5'', J<sub>5''-4''</sub> = 7.5 Hz, J<sub>5''-3''</sub> = 1.1 Hz), 4.93 (dd, 1H, H-3', J = 8.4 Hz, J = 5.2 Hz, 1H), 3.64 (t, 2H, H-1', J = 6.9 Hz), 2.35 – 2.22 (m, 2H, H-2'). <sup>13</sup>C RMN (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 164.70 (C-2), 146.14 (C-2''), 135.66 (q, C-4''', J = 33.4 Hz), 134.33 (d, C-1''', J = 1.4 Hz), 130.07 (C-2''', C-6'''), 129.32 (C-4''), 129.13 (C-1''), 128.08 (C-6''), 127.19 (q, C-3''', C-5''', J = 3.8 Hz), 124.88 (q, CF<sub>3</sub>, J = 271.6 Hz), 119.36 (C-5''), 118.13 (C-3''), 71.32 (C-3'), 41.97 (C-1'), 34.29 (C-2'). **MS (LSIMS):** m/z calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>OF<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 338.1480, encontrado: 338.1504.

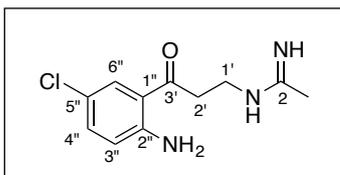
**Procedimiento general para la obtención de los derivados de *N*-(3-(2-amino-5-sustituidofenil)-3-oxopropil)imidamidas (FAB-22 – FAB-29)**



Se disuelve 1 mmol del correspondiente **130a-i** en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada, a continuación, se añaden 10 mmol (558 mg) de Fe en polvo y 1 mmol (278 mg) de sulfato de hierro. Se calienta la mezcla de reacción a reflujo durante 1.5 horas. Para finalizar la reacción, se deja alcanzar la temperatura ambiente y se filtran los residuos insolubles a través de zeolita en una placa filtrante y un kitasato. La disolución acuosa resultante se concentra al rotavapor conectado a una bomba de aceite y se purifica por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (8:1) saturando con NH<sub>4</sub>OH.

### N-(3-(2-Amino-5-clorofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (FAB-22)

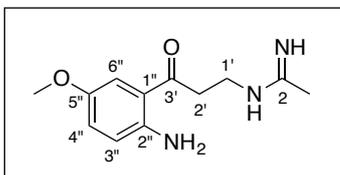
A partir de 1 mmol (269 mg) de **130a** se obtienen 0.78 mmol (187 mg) de un sirupo naranja. Rto: 78%.



**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.73 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.4$  Hz), 7.21 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.9$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.4$  Hz), 6.79 (d, 1H, H-3'',  $J_{4''-3''} = 8.9$  Hz), 3.64 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 6.1$  Hz), 3.35 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'} = 6.1$  Hz), 2.22 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  199.04 (C-3'), 166.01 (C-2), 151.38 (C-2''), 135.53 (C-4''), 130.86 (C-6''), 120.16 (C-1''), 120.09 (C-3''), 118.36 (C-5''), 38.59 (C-1'), 37.46 (C-2'), 18.95 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OCl [M + H]<sup>+</sup>: 240.0904, encontrado: 240.0886.

### N-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-oxopropil)acetimidamida (FAB-23)

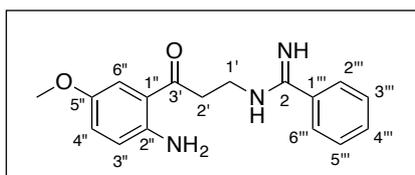
A partir de 1 mmol (265 mg) de **130b** se obtienen 0.69 mmol (162 mg) de un sirupo marrón. Rto: 69%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.23 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.8$  Hz, 1H), 7.01 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.0$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.8$  Hz), 6.78 (d, 1H, H-3'',  $J_{4''-3''} = 9.0$  Hz), 3.78 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.66 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 6.1$  Hz), 3.39 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'} = 6.1$  Hz), 2.23 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  199.50 (C-3'), 166.01 (C-2), 151.24 (C-5''), 147.48 (C-2''), 125.13 (C-4''), 120.01 (C-3''), 117.82 (C-1''), 113.87 (C-6''), 56.45 (-OCH<sub>3</sub>), 38.73 (C-1'), 37.58 (C-2'), 18.90 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 236.1399, encontrado: 236.1388.

### N-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-oxopropil)benzimidamida (FAB-24)

A partir de 1 mmol (328 mg) de **130c** se obtienen 0.84 mmol (249 mg) de un sirupo naranja. Rto: 84%.

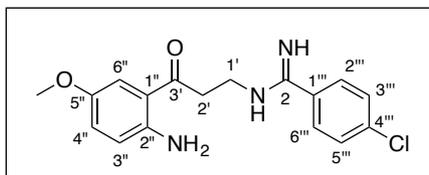


**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.80 – 7.74 (m, 3H, H-2''', H-4''', H-6'''), 7.64 (dd, 2H, H-3''', H-5''',  $J = 10.9$  Hz,  $J = 4.5$  Hz), 7.30 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.9$  Hz), 7.05 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.0$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.9$  Hz), 6.81 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.0$  Hz), 3.91 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'}$

$_{1'} = 6.2$  Hz), 3.82 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.55 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 6.2$  Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  199.81 (C-3'), 165.88 (C-2), 151.27 (C-5''), 147.48 (C-2''), 134.60 (C-4'''), 130.62 (C-1'''), 130.34 (C-2''', C-6'''), 128.94 (C-3''', C-5'''), 125.20 (C-4''), 120.05 (C-3''), 117.91 (C-1''), 113.94 (C-6''), 56.51 (-OCH<sub>3</sub>), 39.74 (C-1'), 37.66 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 298.1556, encontrado: 298.1553.

### N-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-oxopropil)-4-clorobenzimidamida (FAB-25)

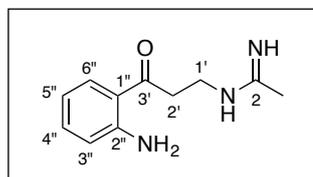
A partir de 1 mmol (361 mg) de **130d** se obtienen 0.83 mmol (274 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 83%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.76 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 8.5$  Hz), 7.66 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.5$  Hz), 7.29 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-4''} = 2.7$  Hz), 7.08 (dd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 9.0$  Hz,  $J_{4''-6''} = 2.7$  Hz), 6.85 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 9.0$  Hz), 3.89 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 6.0$  Hz), 3.81 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.35 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'} = 6.0$  Hz). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  199.73 (C-3'), 164.97 (C-2), 151.28 (C-5''), 147.51 (C-2''), 140.77 (C-4'''), 130.76 (C-2''', C-6'''), 130.65 (C-3''', C-5'''), 130.55 (C-1'''), 125.22 (C-4''), 120.04 (C-3''), 117.89 (C-1''), 113.96 (C-6''), 56.50 (-OCH<sub>3</sub>), 47.94 (C-1'), 39.70 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Cl [M + H]<sup>+</sup>: 332.1166, encontrado: 332.1179.

### N-(3-(2-Aminofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (FAB-26)

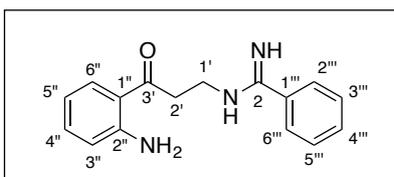
A partir de 1 mmol (235 mg) de **130f** se obtienen 0.88 mmol (180 mg) de un sólido naranja. Rto: 88%. P.f: 130 - 133 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (500.13 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.79 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 8.2$  Hz,  $J_{6''-4''} = 1.5$  Hz), 7.30 (ddd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.4$  Hz,  $J_{4''-5''} = 6.9$  Hz,  $J_{4''-6''} = 1.5$  Hz), 6.80 (dd, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.4$  Hz,  $J_{3''-5''} = 1.2$  Hz), 6.65 (ddd, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 8.2$  Hz,  $J_{5''-4''} = 6.9$  Hz,  $J_{5''-3''} = 1.2$  Hz), 3.67 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 6.1$  Hz), 3.40 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'} = 6.1$  Hz), 2.24 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C RMN** (125.76 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  199.90 (C-3'), 166.03 (C-2), 152.81 (C-2''), 135.75 (C-4''), 131.97 (C-6''), 118.42 (C-5''), 118.05 (C-1''), 116.27 (C-3''), 38.72 (C-1'), 37.40 (C-2'), 18.87 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 206.1293, encontrado: 206.1291.

### N-(3-(2-Aminofenil)-3-oxopropil)benzimidamida (FAB-27)

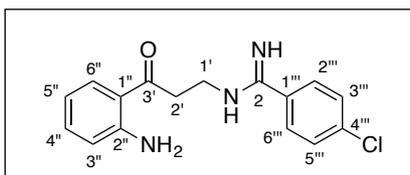
A partir de 1 mmol (297 mg) de **130g** se obtienen 0.52 mmol (138 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 52%.



$^1\text{H RMN}$  (400.45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.72 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 8.2$  Hz,  $J_{6''-4''} = 1.3$  Hz), 7.65 – 7.60 (m, 2H, H-2''', H-6'''), 7.59 – 7.56 (m, 1H, H-4'''), 7.48 (dd, 2H, H-3''', H-5''',  $J = 10.8$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 7.18 (ddd, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = 8.4$  Hz,  $J_{4''-5''} = 7.0$  Hz,  $J_{4''-6''} = 1.3$  Hz), 6.70 (dd, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.4$  Hz,  $J_{3''-5''} = 1.1$  Hz), 6.54 (ddd, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 8.2$  Hz,  $J_{5''-4''} = 7.0$  Hz,  $J_{5''-3''} = 1.1$  Hz), 3.76 – 3.69 (m, 2H, H-1'), 3.31 – 3.25 (m, 2H, H-2').  $^{13}\text{C RMN}$  (100.70 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  200.56 (C-3'), 165.62 (C-2), 152.67 (C-2''), 135.62 (C-4''), 133.99 (C-4'''), 132.10 (C-6''), 131.87 (C-1'''), 130.18 (C-2''', C-6'''), 128.71 (C-3''', C-5'''), 118.38 (C-5''), 117.59 (C-1''), 116.30 (C-3''), 43.45 (C-1'), 39.72 (C-2'). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 268.1450, encontrado: 268.1440.

### N-(3-(2-Aminofenil)-3-oxopropil)-4-clorobenzimidamida (FAB-28)

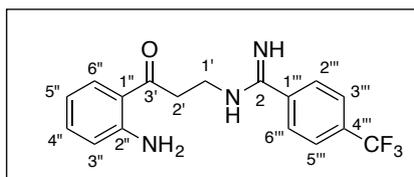
A partir de 1 mmol (331 mg) de **130h** se obtienen 0.75 mmol (225 mg) de un sirupo marrón. Rto: 75%.



$^1\text{H RMN}$  (600.24 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.73 (d, 1H, H-6'',  $J = 5.8$  Hz), 7.54 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2''-3''} = J_{6'''-5'''} = 8.5$  Hz), 7.35 (d, 2H, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.5$  Hz), 7.18 (t, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = J_{4''-5''} = 8.0$  Hz), 6.69 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 8.0$  Hz), 6.54 (t, 1H, H-5'',  $J_{5''-4''} = 8.0$  Hz), 3.47 (t, 2H, H-1',  $J_{1'-2'} = 7.5$  Hz), 2.91 (t, 2H, H-2',  $J_{2'-1'} = 7.5$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (150.95 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  202.69 (C-3'), 165.03 (C-2), 152.54 (C-2''), 137.20 (C-4'''), 136.76 (C-1''), 134.25 (C-4''), 132.23 (C-1'''), 129.60 (C-2''', C-6'''), 129.56 (C-3''', C-5''') 127.31 (C-6''), 118.04 (C-5''), 115.56 (C-3''), 40.53 (C-1'), 34.90 (C-2'). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OCl}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 302.1060, encontrado: 302.1036.

### N-(3-(2-Aminofenil)-3-oxopropil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (FAB-29)

A partir de 1 mmol (365 mg) de **130i** se obtienen 0.78 mmol (261 mg) de un sirupo naranja. Rto: 78%.

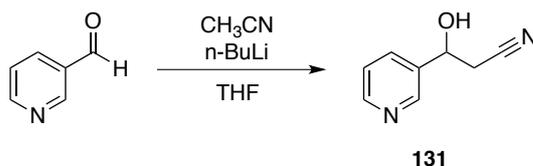


$^1\text{H RMN}$  (400.45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$

8.22 (d, 1H, H-3'',  $J_{3''-4''} = 7.6$  Hz), 7.99 (q, 4H, H-2''', H-3''', H-5''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = J_{6'''-5'''} = 8.8$  Hz), 7.91 (t, 1H, H-4'',  $J_{4''-3''} = J_{4''-5''} = 7.6$  Hz), 7.80 (t, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = J_{5''-4''} = 7.6$  Hz), 7.72 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 7.6$  Hz), 4.03 – 3.94 (m, 2H, H-1'), 3.36 – 3.33 (m, 2H, H-2').  $^{13}\text{C RMN}$  (100.69 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  201.18 (C-3'), 165.16 (C-2), 147.24 (C-2''), 137.81 (C-1''), 135.78 (q, C-4''',  $J = 33.2$  Hz), 135.76 (C-4''), 134.53 (C-1'''), 132.57 (C-5''), 130.13 (C-2''', C-6'''), 128.84 (C-6''), 127.23 (q, C-3''', C-5''',  $J = 3.5$  Hz), 125.66 (C-3''), 124.92 (q,  $\text{CF}_3$ ,  $J = 271.7$  Hz), 38.68 (C-1'), 37.78 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OF}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 336.1324, encontrado: 336.1308.

#### 3.1.5. Síntesis de la Familia D

##### 3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propanonitrilo (131)



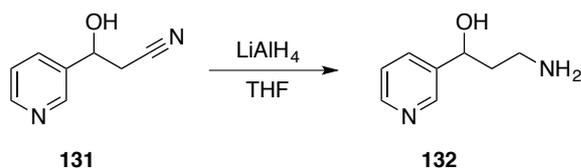
La noche anterior a la reacción se debe anhidricar un matraz de 3 bocas, un embudo de adición y un fijador de termómetros, todos sin las partes de plástico. Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar, realizamos el siguiente montaje: Una boca para termómetro de baja temperatura, otra boca para el embudo de adición y la última para el septum con entrada de Ar.

En el matraz se introducen 20 ml (2/3 del volumen total) de THF anhidro y se reduce la temperatura hasta  $-78$  °C usando un baño de hielo seco y acetona. Seguidamente, se adicionan 20 mmol (12.5 ml) de butil-litio 1.6 M en hexano y, gota a gota, adicionamos 30 mmol (1.572 ml) de acetonitrilo. Se agita durante 1 hora, hasta que la disolución toma un ligero color salmón. Transcurrido este tiempo, se procede a diluir 10 mmol de 3-piridincarboxaldehído, con 10 ml de THF en el propio embudo de adición. A continuación, esta disolución se hace gotear sobre la reacción, vigilando

que la temperatura no suba de - 60 °C. Una vez completado este proceso se deja agitando otros 30 minutos a - 78 °C, se retira el baño y se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente.

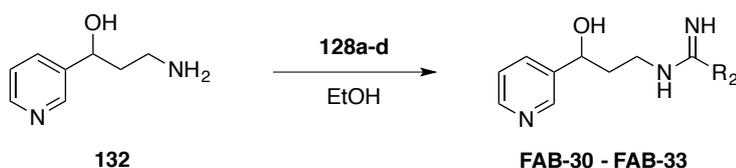
La reacción se neutraliza mediante la adición de 25 ml de H<sub>2</sub>O fría, seguidamente se concentra al rotavapor. El crudo resultante se purifica por cromatografía en columna (AcOEt.Hex) (4:1). Se obtienen 9.43 mmol (1.40 g) de un sirupo naranja. Rto: 94%.

### 3-Amino-1-(piridin-3-il)propan-1-ol (**132**)



Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar, se disuelven 2 mmol de **131** en 10 ml THF anhidro. Paralelamente, en otro matraz, se suspenden 7.5 mmol (285 mg) de hidruro de litio y aluminio en 15 ml de THF anhidro. Una vez se han adicionado los disolventes, el matraz con LiAlH<sub>4</sub> se enfria a 0 °C mediante un baño de hielo, a continuación se procede al canulado del nitrilo sobre la suspensión del hidruro a un ritmo no muy elevado pero constante. Transcurridos 20 minutos, se procede a la neutralización del exceso de reactivo, para ello se añade gota a gota 10 ml de una disolución acuosa de NaOH 5 M hasta el cese del burbujeo. A continuación añadimos 600 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y dejamos agitando 15 minutos. Posteriormente, los residuos sólidos se filtran a través de placa filtrante con celita y Kitasato, lavando con una mezcla de (DCM:MeOH) (7:3) saturada de NH<sub>4</sub>OH. El filtrado se concentra al rotavapor obteniéndose un sirupo naranja que se utiliza directamente en la siguiente reacción.

### Procedimiento general para la obtención de N-(3-hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)imidamidas (FAB-30 – FAB-33)

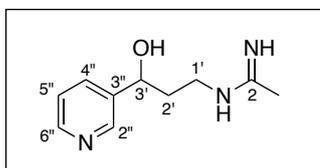


Sobre una solución de 2 mmol de la amina **132** en 10 ml MeOH, enfriada a 0 °C mediante baño de hielo, se añaden 3 mmol de los diferentes imidatos

**128a-d.** Se mantiene agitando la mezcla de reacción durante 15 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se concentra a rotavapor para eliminar los disolventes orgánicos. El crudo resultante se somete a purificación por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (7:3) saturando con NH<sub>4</sub>.

#### *N*-(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propilacetimidamida (FAB-30)

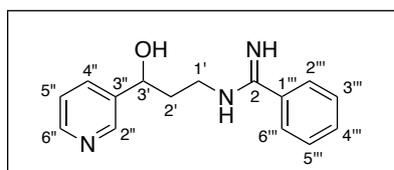
Utilizando 3 mmol (368 mg) de **128a** se obtienen 1.96 mmol (378 mg) de un sirupo amarillo. Rto: 98%.



<sup>1</sup>H-RMN (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.51 (d, 1H, H-2'',  $J_{2''-4''} = 2.0$  Hz), 8.40 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 4.9$  Hz,  $J_{6''-4''} = 2.0$  Hz), 7.83 (dt, 1H, H-4'',  $J_{4''-5''} = 8.0$  Hz,  $J_{4''-2''} = J_{4''-6''} = 2.0$  Hz), 7.32 (ddd, 1H, H-5'',  $J_{5''-4''} = 8.0$  Hz,  $J_{5''-6''} = 4.9$  Hz,  $J = 0.9$  Hz), 4.78 (dd, 1H, H-3',  $J = 8.6$  Hz, 4.6 Hz), 3.48 – 3.29 (m, 2H, H-1'), 2.13 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.02 – 1.92 (m, 2H, H-2'). <sup>13</sup>C RMN (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  163.79 (C-2), 148.04 (C-6''), 147.46 (C-2''), 140.92 (C-3''), 133.35 (C-4''), 123.30 (C-5''), 67.28 (C-3'), 38.89 (C-1'), 36.80 (C-2'), 18.47 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O [M + H]<sup>+</sup>: 194.1293, encontrado: 194.1306.

#### *N*-(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propilbenzimidamida (FAB-31)

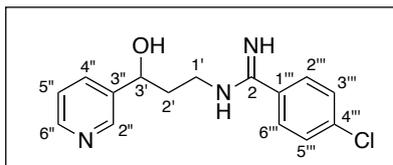
Utilizando 3 mmol (924 mg) de **128b** se obtienen 1.41 mmol (357 mg) de un sólido amarillo. Rto: 70%. Pf: 178 - 180 °C.



<sup>1</sup>H RMN (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.65 (d, 1H, H-2'',  $J_{2''-4''} = 2.0$  Hz), 8.48 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 4.9$  Hz,  $J_{6''-4''} = 2.0$  Hz), 7.98 (dt, 1H, H-4'',  $J_{4''-5''} = 7.9$  Hz,  $J_{4''-2''} = J_{4''-6''} = 2.0$  Hz), 7.81 – 7.77 (m, 2H, H-2''', H-6'''), 7.75 (tt, 1H, H-4''',  $J = 7.5$  Hz,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 1.3$  Hz,  $J = 1.3$  Hz), 7.66 – 7.61 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 7.48 (ddd, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 7.9$  Hz,  $J_{5''-4''} = 4.9$  Hz,  $J = 0.9$  Hz), 5.00 (dd, 1H, H-3',  $J = 9.1$  Hz,  $J = 4.1$  Hz), 3.78 – 3.66 (m, 2H, H-1'), 2.29 – 2.14 (m, 2H, H-2'). <sup>13</sup>C RMN (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  165.86 (C-2), 149.06 (C-6''), 148.00 (C-2''), 142.18 (C-3''), 135.90 (C-4''), 134.66 (C-4'''), 130.50 (C-1'''), 130.39 (C-3'''), C-5'''), 128.95 (C-2''', C-6'''), 125.26 (C-5''), 69.99 (C-3'), 41.54 (C-1'), 37.43 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O [M + H]<sup>+</sup>: 256.1450, encontrado: 256.1445.

#### 4-Cloro-N-(3-hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)benzimidamida (FAB-32)

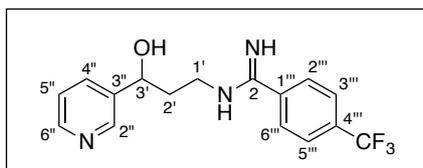
Utilizando 3 mmol (1.02 g) de **128c** se obtienen 1.44 mmol (416 mg) de un sólido blanco-amarillento. Rto: 72%. Pf: 200 - 202 °C.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.61 (d, 1H, H-2'',  $J_{2''-4''} = 2.2$  Hz), 8.41 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 4.9$  Hz,  $J_{6''-4''} = 1.6$  Hz), 7.94 (dddd, 1H, H-4'',  $J_{4''-5''} = 7.9$  Hz,  $J_{4''-2''} = 2.2$  Hz,  $J_{4''-6''} = 1.6$  Hz,  $J = 0.6$  Hz), 7.77 (d, 2H, H-2''', H-6''',  $J_{2'''-3'''} = J_{6'''-5'''} = 8.9$  Hz), 7.59 (d, H-3''', H-5''',  $J_{3'''-2'''} = J_{5'''-6'''} = 8.9$  Hz), 7.42 (ddd, H-5'',  $J_{5''-6''} = 8.0$  Hz,  $J_{5''-4''} = 4.9$  Hz,  $J = 0.6$  Hz), 4.98 (dd, 1H, H-3',  $J = 9.1$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 3.75 - 3.62 (m, 2H, H-1'), 2.26 - 2.10 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (100.70 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  164.70 (C-2), 148.90 (C-6''), 147.92 (C-2''), 142.06 (C-3''), 140.63 (C-1'''), 135.92 (C-4''), 130.84 (C-2''', C-6'''), 130.49 (C-3''', C-5'''), 128.85 (C-4'''), 125.21 (C-5''), 69.80 (C-3'), 41.64 (C-1'), 37.34 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OCl [M + H]<sup>+</sup>: 290.1060, encontrado: 290.1059.

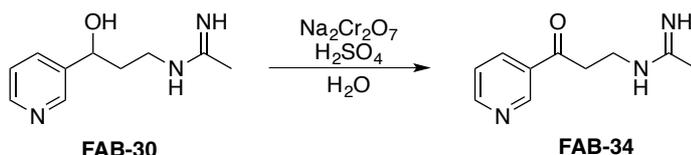
#### N-(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)-4-(trifluorometil)propil)benzimidamida (FAB-33)

Utilizando 3 mmol (1.13 g) de **128d** se obtienen 1.26 mmol (407 mg) de un sólido blanco. Rto: 63%. %. Pf: 195 - 197 °C.

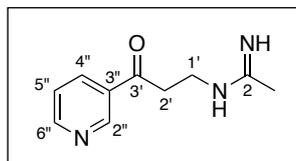


**<sup>1</sup>H RMN** (499.79 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.65 (d, 1H, H-2'',  $J = 2.2$  Hz), 8.49 (dd, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 4.9$  Hz,  $J = 1.6$  Hz), 8.00 - 7.99 (m, 1H, H-4''), 7.97 (q, 4H, H-2''', H-3''', H-5''', H-6''',  $J = 8.2$  Hz), 7.49 (ddd, H-5'',  $J = 7.8$  Hz,  $J_{5''-6''} = 4.9$  Hz,  $J = 0.8$  Hz), 5.00 (dd, 1H, H-3',  $J = 9.0$  Hz,  $J = 4.1$  Hz), 3.84 - 3.64 (m, 2H, H-1'), 2.37 - 2.10 (m, 2H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (125.69 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  164.93 (C-2), 149.12 (C-6''), 148.03 (C-2''), 142.21 (C-3''), 135.92 (C-4''), 135.74 (q, C-4''',  $J = 33.0$  Hz), 134.33 (C-1'''), 130.14 (C-2''', C-6'''), 127.26 (q, C-3''', C-5''',  $J = 3.8$  Hz), 125.29 (C-5''), 124.90 (q, CF<sub>3</sub>,  $J = 272.1$  Hz), 69.96 (C-3'), 41.73 (C-1'), 37.36 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OF<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 324.1324, encontrado: 324.1298.

### N-(3-Oxo-3-(piridin-3-il)propilacetimidamida (FAB-34)



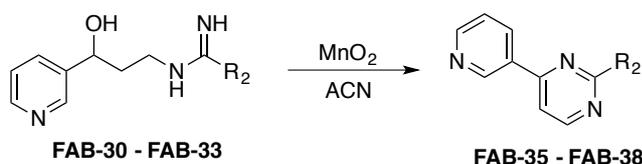
Se disuelve 1 mmol (193 mg) de **FAB-30** en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada, a continuación añadimos 0.5 mmol (135 mg) de dicromato de sodio y enfriamos la mezcla a 0 °C mediante un baño de hielo. Posteriormente, añadimos 0.4 ml de una solución 10 M de ácido sulfúrico y se mantiene agitando durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se adicionan 5 ml de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se elimina el agua concentrando al rotavapor conectado a una bomba de aceite. Las sales que se obtienen como resultado se filtran lavándolas con metanol. El disolvente se evapora al rotavapor y se precede a purificar por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (8:2) saturando con NH<sub>4</sub>OH. Se obtienen 0.2 mmol (30 mg) de un sirupo transparente. Rto: 20%.



<sup>1</sup>H RMN (499.79 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.17 (d, 1H, H-2'', J<sub>2''-4''</sub> = 1.7 Hz), 8.80 (dd, 1H, H-6'', J<sub>6''-5''</sub> = 4.8 Hz, J<sub>6''-4''</sub> = 1.7 Hz), 8.22 (dt, 1H, H-4'', J<sub>4''-5''</sub> = 8.0 Hz, J<sub>4''-6''</sub> = J<sub>4''-2''</sub> = 1.7 Hz), 7.44 (dd, 1H, H-5'', J<sub>5''-4''</sub> = 8.0 Hz, J<sub>5''-6''</sub> = 4.8 Hz), 3.69 (q, 2H, H-1', J = 5.8 Hz), 3.26 (t, 2H, H-2' J = 5.5 Hz), 1.96 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (125.69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 198.66 (C-3'), 170.35 (C-2), 154.10 (C-2''), 149.78 (C-6''), 135.43 (C-4''), 131.82 (C-3''), 123.85 (C-5''), 38.72 (C-2'), 34.22 (C-1'), 23.47 (-CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):** m/z calculado para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O [M + H]<sup>+</sup>: 192.1137, encontrado: 192.1128.

### 3.1.6. Síntesis de la Familia E

#### Procedimiento general para la obtención de 2-sustituído-4-(piridin-3-il)pirimidinas (FAB-35 – FAB-38)

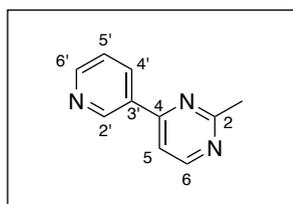


Trabajando en condiciones de atmosfera inerte de Ar, se disuelve 1 mmol de la correspondiente imidamida (FAB-30 – FAB-33) en 20 ml de acetonitrilo con ayuda de sonicador y pistola de calor. A continuación, se añaden 10 mmol (870 mg) de dióxido de manganeso y se mantiene bajo fuerte agitación durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se filtra la mezcla de reacción utilizando zeolita, placa filtrante y Kitasato. El liquido resultante se concentra al rotavapor y se purifica por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (95:5).

## 2-Metil-4-(piridin-3-il)pirimidina (FAB-35)

Partiendo de 193 mg de **FAB-30** se obtienen 0.63 mmol (100 mg) de un sólido blanco. Rto: 63%. Pf: - °C.

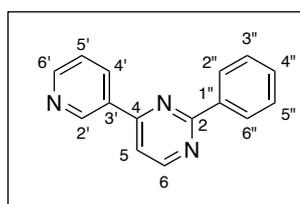
<sup>1</sup>H RMN (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.26 (s, 1H, H-2'), 8.73 (d, 2H, H-6, H-6', J<sub>6-5</sub> = 5.3 Hz), 8.42 (dt, 1H, H-4', J<sub>4'-5'</sub> = 8.0 Hz, J = 1.9 Hz), 7.55 (d, 1H, H-5, J<sub>5-6</sub> = 5.3 Hz), 7.45 (dd, 1H, H-5', J<sub>5'-4'</sub> = 8.0 Hz, J = 4.9 Hz), 2.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (125.76 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.02 (C-2), 161.85 (C-4), 158.02 (C-6), 151.76 (C-6'), 148.70 (C-2'), 134.85 (C-4'), 132.81 (C-3'), 123.93 (C-5'), 114.12 (C-5), 26.41 (CH<sub>3</sub>). **MS (LSIMS):** m/z calculado para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 172.0875, encontrado: 172.0859.



## 2-Fenil-4-(piridin-3-il)pirimidina (FAB-36)

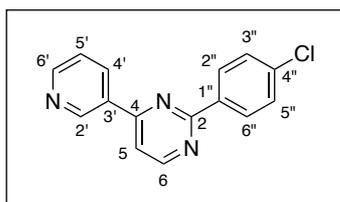
Partiendo de 255 mg de **FAB-31** se obtienen 0.48 mmol (112 mg) de un sólido blanco. Rto: 48%. Pf: - °C.

<sup>1</sup>H-RMN (400.16 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.40 (d, 1H, H-2', J<sub>2'-6'</sub> = 1.7 Hz), 8.90 (d, 1H, H-6, J<sub>6-5</sub> = 5.2 Hz), 8.77 (dd, 1H, H-6', J<sub>6'-5'</sub> = 4.8 Hz, J<sub>6'-2'</sub> = 1.7 Hz), 8.60 - 8.53 (m, 3H, H-4', H-2'', H-6''), 7.63 (d, 1H, H-5, J<sub>5-6</sub> = 5.2 Hz), 7.55 - 7.51 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''), 7.49 (ddd, 1H, H-5', J = 8.0 Hz, J<sub>5'-6'</sub> = 4.8 Hz, J = 0.9 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (100.63 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.09 (C-2), 161.78 (C-4), 158.41 (C-6), 151.83 (C-6'), 148.75 (C-2'), 137.61 (C-1''), 134.84 (C-4'), 132.83 (C-3'), 131.16 (C-4''), 128.78 (C-2'', C-6''), 128.48 (C-3'', C-5''), 123.94 (C-5'), 114.69 (C-5). **MS (LSIMS):** m/z calculado para C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 234.1031, encontrado: 234.1025.



## 2-(4-Clorofenil)-4-(piridin-3-il)pirimidina (FAB-37)

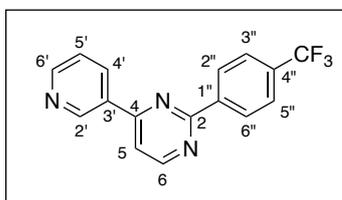
Partiendo de 289 mg de **FAB-32** se obtienen 0.35 mmol (94 mg) de un sólido amarillo. Rto: 35%. Pf: - °C.



$^1\text{H-RMN}$  (400.16 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.39 (d, 1H, H-2',  $J = 1.0$  Hz), 8.89 (d, 1H, H-6,  $J_{6-5} = 5.2$  Hz), 8.78 (dd, 1H, H-6',  $J = 4.5$  Hz,  $J = 0.9$  Hz), 8.57 - 8.49 (m, 3H, H-4', H-2'', H-6''), 7.65 (d, 1H, H-5,  $J_{5-6} = 5.2$  Hz), 7.54 - 7.47 (m, 3H, H-5', H-3'', H-5'').  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.16 (C-2), 161.90 (C-4), 158.46 (C-6), 151.93 (C-6'), 148.73 (C-2'), 137.43 (C-4''), 136.11 (C-1''), 134.83 (C-4'), 132.68 (C-3'), 129.83 (C-2'', C-6''), 129.01 (C-3'', C-5''), 123.97 (C-5'), 114.88 (C-5). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{Cl}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 268.0642, encontrado: 268.0638.

## 4-(Piridin-3-il)-2-(4-(trifluorometil)fenil)pirimidina (FAB-38)

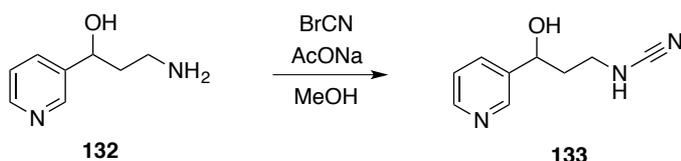
Partiendo de 323 mg de **FAB-33** se obtienen 0.81 mmol (244 mg) de un sólido blanco. Rto: 81%. Pf: - °C.



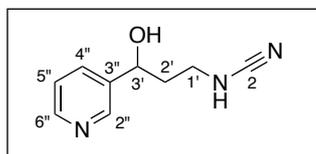
$^1\text{H RMN}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.41 (d, 1H, H-2',  $J_{2'-4'} = 1.9$  Hz), 8.92 (d, 1H, H-6,  $J_{6-5} = 5.2$  Hz), 8.79 (dd, 1H, H-6',  $J_{6'-5'} = 4.9$  Hz,  $J_{6'-4'} = 1.9$  Hz), 8.68 (d, 2H, H-2'', H-6''),  $J_{2''-3''} = J_{6''-5''} = 8.3$  Hz), 8.56 (dt, 1H, H-4',  $J_{4'-5'} = 8.0$  Hz,  $J_{4'-2'} = J_{4'-6'} = 1.9$  Hz), 7.77 (d, 2H, H-3'', H-5''),  $J_{3''-4''} = J_{5''-6''} = 8.3$  Hz), 7.69 (d, 1H, H-5,  $J_{5-6} = 5.2$  Hz), 7.53 (dd, 1H, H-5',  $J_{5'-4'} = 8.0$  Hz,  $J_{5'-6'} = 4.9$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.76 (C-2), 161.78 (C-4), 158.61 (C-6), 151.51 (C-6'), 148.29 (C-2'), 140.77 (C-1''), 135.22 (C-4'), 132.71 (C-4'', q,  $J = 32.3$  Hz), 132.69 (C-3'), 128.76 (C-2'', C-6''), 125.68 (C-3'', C-5'', q,  $J = 3.9$  Hz), 124.24 ( $\text{CF}_3$ , q,  $J = 272.4$  Hz), 124.15 (C-5'), 115.40 (C-5). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{F}_3$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 302.0905, encontrado: 302.0929.

### 3.1.7. Síntesis de la Familia F

#### *N*-(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)cianamida (133)

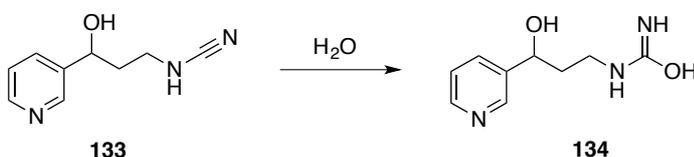


En primer lugar, sobre una disolución de 2.09 mmol de la amina **132** en DCM/MeOH, se añaden 8.36 mmol (660 mg) de acetato de sodio anhidro. Esta mezcla se concentra a rotavapor para eliminar la mayor parte del disolvente y se somete a secado intensivo en el desecador durante al menos 24 horas. Una vez hemos obtenido un sólido seco, se trabaja en condiciones de atmósfera inerte de Ar, disolviendo en 10 ml de MeOH anhidro la mezcla de reactivos. A continuación, se hace descender la temperatura de la reacción a 0 °C mediante baño de hielo y se procede a añadir 4.18 mmol (400 mg) de bromuro de cianógeno, al finalizar la adición se deja alcanzar la temperatura ambiente retirando el baño de hielo. Transcurridas 2 horas, se controla el avance por TLC (DCM:MeOH) (9:1) para apreciar la aparición de **133** y (7:3) para observar la desaparición de **132**. Finalmente se concentra a rotavapor y se purifica directamente por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (95:5). Se obtienen 1.79 mmol (317 mg) de un sirupo naranja. Rto: 85%.

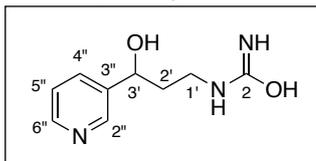


<sup>1</sup>H RMN (400.16 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.57 (s, 1H, H-2''), 8.47 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''}$  = 4.9 Hz), 7.90 (d, 1H, H-4'',  $J_{4''-5''}$  = 7.9 Hz), 7.46 (dd, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''}$  = 7.9 Hz,  $J_{5''-4''}$  = 4.9 Hz), 4.85 (m, 1H, H-3'), 3.28 – 3.10 (m, 2H, H-1'), 2.08 – 1.92 (m, 2H, H-2'). <sup>13</sup>C RMN (100.63 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  148.91 (C-6''), 147.89 (C-2''), 142.56 (C-3''), 135.99 (C-4''), 125.30 (C-5''), 124.41 (C-2), 69.46 (C-3'), 43.45 (C-1'), 39.90 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O [M + H]<sup>+</sup>: 178.0980, encontrado: 178.0990.

#### Ácido *N*-(3-hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)carbamimídico (134)

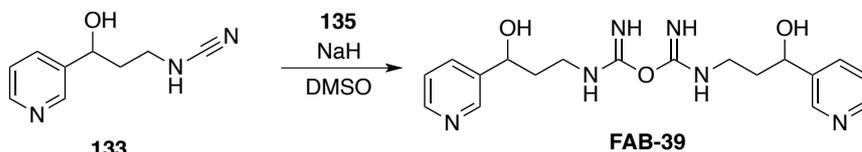


En las reacciones en las que se utiliza la cianamida **133**, cualquier traza de agua puede dar lugar a la formación del intermedio de reacción **134**. Aislado por purificación en columna de silicagel, mezcla de disolventes (DCM:MeOH) (85:15). Rto máximo: 20%.



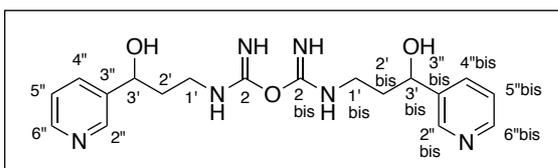
$^1\text{H RMN}$  (400.16 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.54 (s, 1H, H-2''), 8.42 (d, 1H, H-6'',  $J_{6''-5''} = 4.8$  Hz), 7.86 (d, 1H, H-4'',  $J_{4''-5''} = 7.5$  Hz), 7.42 (dd, 1H, H-5'',  $J_{5''-6''} = 7.5$  Hz,  $J_{5''-4''} = 4.8$  Hz), 4.78 (dd, 1H, H-3',  $J = 7.7$  Hz,  $J = 5.4$  Hz), 3.23 (ddt, 2H, H-1',  $J = 20.0$  Hz,  $J = 13.3$  Hz,  $J = 6.6$  Hz), 1.88 (dt, 2H, H-2',  $J = 10.9$  Hz,  $J = 7.3$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  (100.63 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  162.38 (C-2), 148.74 (C-6''), 147.98 (C-2''), 142.69 (C-3''), 135.94 (C-4''), 125.18 (C-5''), 70.21 (C-3'), 40.37, 37.90 (C-1'), 35.37 (C-2'). **MS (LSIMS):**  $m/z$  calculado para  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 196.1008, encontrado: 196.0943.

*N*-(3-Hidroxi-3-piridin-3-ilpropil)imidocarbamato de [(3-hidroxi-3-piridin-3-ilpropil)amino](imino)metilo (FAB-39)



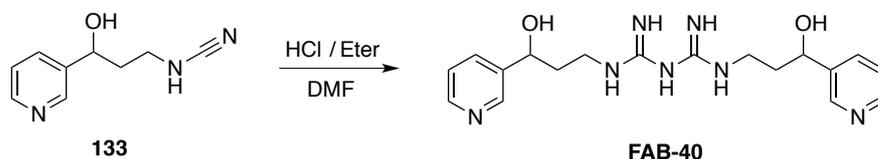
Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar se disuelven 1.5 mmol (292 mg) de **134** en 5 ml DMSO; a continuación, se agregan 1.8 mmol (72 mg) de hidruro de sodio al 60% y se mantiene agitando durante una hora. Transcurrido este tiempo, se añade gota a gota 1 mmol (177 mg) de **133** disuelto en 5 ml de DMSO. Tras 24 horas se corta el avance de la reacción mediante la adición de hielo, una vez concentrado al máximo posible se purifica por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (9:1). Se obtienen 0.46 mmol (171 mg) de un sirupo naranja. Rto: 46%.

$^1\text{H RMN}$  (400.16 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.55 (s, 2H, H-2'', H-2''bis), 8.44 (d, 2H, H-6'', H-6''bis,  $J_{6''-5''} = J_{6''\text{bis}-5''\text{bis}} = 4.9$  Hz), 7.87 (d, 2H, H-4'', H-4''bis,  $J_{4''-5''} = J_{4''\text{bis}-5''\text{bis}} = 7.9$  Hz), 7.43 (dd, 2H, H-5'', H-5''bis,  $J_{5''-6''} = J_{5''\text{bis}-6''\text{bis}} = 7.9$  Hz,  $J_{5''-4''} = J_{5''\text{bis}-4''\text{bis}} = 4.9$  Hz), 4.79 (dd, 2H, H-3', H-3'bis,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 5.4$  Hz), 3.29 – 3.18 (m, 4H, H-1', H-1'bis,  $J = 20.1$  Hz,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 6.7$  Hz), 1.95 – 1.84

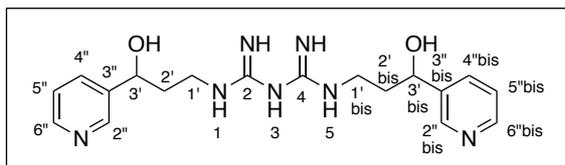


(m, 4H, H-2', H-2' bis). <sup>13</sup>C RMN (100.63 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 162.40 (C-2, C-2bis), 148.85 (C-6'', C-6''bis), 148.08 (C-2'', C-2''bis), 142.66 (C-3'', C-3''bis), 135.83 (C-4'', C-4''bis), 125.15 (C-5'', C-5''bis), 70.29 (C-3', C-3'bis), 40.39 (C-1', C-1'bis), 37.95 (C-2', C-2'bis). **MS (LSIMS):** m/z calculado para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 373.1998, encontrado: 373.1998.

### 1,5-bis(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)biguanidina (FAB-40)

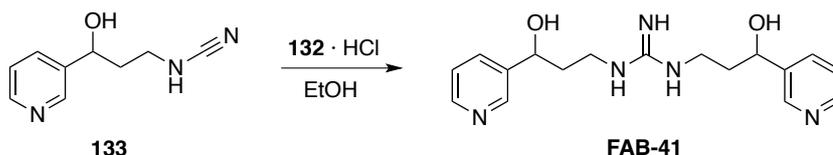


Trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar se disuelven 3 mmol (532 mg) de **133** en 7 ml de DMF, a continuación, se añaden 5 ml de una solución 1 M de HCl en éter y se lleva a reflujo durante una hora. El control del avance de la reacción se realiza por TLC (DCM:MeOH) (8:2). Una vez transcurrido este tiempo, la reacción se corta mediante la adición de 10 ml de NaOH 2 M en agua para después concentrar a rotavapor con bomba de alto vacío. El crudo resultante se somete a purificación por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (9:1) saturando con NH<sub>4</sub>OH. Se obtienen 0.31 mmol (102 mg) de un sirupo naranja. Rto: 20%.



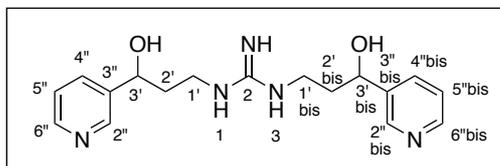
<sup>1</sup>H RMN (400.16 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.60 (s, 2H, H-2'', H-2''bis), 8.49 (d, 2H, H-6'', H-6''bis, J<sub>6''-5''</sub> = J<sub>6''bis-5''bis</sub> = 4.9 Hz), 7.91 (d, 2H, H-4'', H-4''bis, J<sub>4''-5''</sub> = J<sub>4''bis-5''bis</sub> = 7.8 Hz), 7.48 (dd, 2H, H-5'', H-5''bis, J<sub>5''-6''</sub> = J<sub>5''bis-6''bis</sub> = 7.8 Hz, J<sub>5''-4''</sub> = J<sub>5''bis-4''bis</sub> = 4.9 Hz), 4.94 (dd, 2H, H-3', H-3'bis, J = 8.6 Hz, J = 4.2 Hz), 3.23 – 3.06 (m, 4H, H-1', H-1'bis), 2.14 – 1.98 (m, 4H, H-2', H-2' bis). <sup>13</sup>C RMN (100.63 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 170.17 (C-2, C-4), 149.29 (C-6'', C-6''bis), 147.93 (C-2'', C-2''bis), 142.02 (C-3'', C-3''bis), 135.70 (C-4'', C-4''bis), 125.27 (C-5'', C-5''bis), 70.85 (C-3', C-3'bis), 38.69 (C-1', C-1'bis), 36.96 (C-2', C-2'bis). **MS (LSIMS):** m/z calculado para C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 372.2148, encontrado: 372.2148.

***N,N'*-bis(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)guanidina (FAB-41)**



En primer lugar se debe generar el hidrocloreuro de **132**: en un matraz con 1.5 mmol de **132** disueltos en 5 ml de metanol, se adicionan 3 ml de una solución 1 M de HCl en éter, tras agitar durante 15 min y no aparecer ningún precipitado, se concentra a rotavapor y se introduce en el desecador durante 24 horas. A continuación, trabajando en condiciones de atmósfera inerte de Ar, se procede a disolver 1 mmol (177 mg) de **133** en 7 ml de etanol absoluto para seguidamente añadirlos al matraz con **132**·HCl. Esta mezcla se lleva a reflujo durante 3 horas, controlando el avance de la reacción por TLC (DCM:MeOH) (7:3). Una vez agotado el producto de partida se concentra a rotavapor y se purifica por cromatografía en columna (DCM:MeOH) (8:2)

saturando con NH<sub>4</sub>OH. Se obtienen 0.27 mmol (89 mg) de un sirupo naranja. Rto: 27%.



**<sup>1</sup>H RMN** (400.16 MHz, DMSO)  $\delta$  8.60 (d, 2H, H-2'', H-2''bis,  $J_{2''-4''} = J_{2''\text{bis}-4''\text{bis}} = 1.5$  Hz), 8.48 (dd, 2H, H-6'', H-6''bis,  $J_{6''-5''} = J_{6''\text{bis}-5''\text{bis}} = 4.7$  Hz,  $J_{6''-4''} = J_{6''\text{bis}-4''\text{bis}} = 1.5$  Hz), 7.84 (dt, 2H, H-4'', H-4''bis,  $J_{4''-5''} = J_{4''\text{bis}-5''\text{bis}} = 7.8$  Hz,  $J_{4''-2''} = J_{4''\text{bis}-2''\text{bis}} = J_{4''-6''} = J_{4''\text{bis}-6''\text{bis}} = 1.4$  Hz), 7.76 (t, 2H, H-1, H-3,  $J = 5.2$  Hz), 7.49 (s, 1H, =NH), 7.41 (dd, 2H, H-5'', H-5''bis,  $J_{5''-6''} = J_{5''\text{bis}-6''\text{bis}} = 7.9$  Hz,  $J_{5''-4''} = J_{5''\text{bis}-4''\text{bis}} = 4.9$  Hz), 5.68 (s, 2H, -OH, -OHbis), 4.76 (dd, 2H, H-3', H-3'bis,  $J = 8.9$  Hz,  $J = 4.5$  Hz), 3.35 – 3.16 (m, 4H, H-1', H-1'bis), 1.94 – 1.70 (m, 4H, H-2', H-2' bis). **<sup>13</sup>C RMN** (100.63 MHz, DMSO)  $\delta$  156.00 (C-2), 147.52 (C-6'', C-6''bis), 146.78 (C-2'', C-2''bis), 141.15 (C-3'', C-3''bis), 134.29 (C-4'', C-4''bis), 123.68 (C-5'', C-5''bis), 67.49 (C-3', C-3'bis), 38.23 (C-1', C-1'bis), 37.82 (C-2', C-2'bis). **MS (LSIMS)**:  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 330.1930, encontrado: 330.1931.

## 3.2. Evaluación biológica

La determinación de la inhibición enzimática de los productos finales se llevó a cabo siguiendo procedimientos diferentes dependiendo de cada isoforma de la NOS:

### 3.2.1. iNOS y nNOS

La mayoría de los compuestos necesarios para esta fase han sido suministrados por Sigma-Aldrich (Merk), con excepción de la L-[H<sup>3</sup>]-arginina marcada con tritio, proveniente de Amersham Biosciences (Perkin Elmer) y las propias enzimas iNOS y nNOS recombinantes, adquiridas en Enzo Life Sciences (Taper).

En estas dos isoformas, los ensayos de actividad enzimática *in vitro* se realizaron por triplicado, siguiendo la metodología de Bredt & Snyder, la cual expondremos a continuación.

El fundamento básico de esta metodología es el control de la conversión de la L-[<sup>3</sup>H]-arginina a L-[<sup>3</sup>H]-citrulina, gracias a la utilización de un detector Beckman LS 6500 multi-purpose scintillation counter.

El volumen final en el que tiene lugar cada una de las réplicas de los ensayos es de 100 µl, de los cuales:

- 50 µl se corresponden con una solución buffer que contiene hidrócloruro de tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris-HCl) 25 mM, DL-ditiotreitol (DTT) 1 mM, dihidrócloruro de 5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH<sub>4</sub>) 4 µM, flavin-adenin dinucleótido (FAD) 10 µM, hipoxantina-9-β-ribofuranósido (inosina) 0,5 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0.5 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM, L-arginina 10 µM, calmodulina (CaM) 10 µg/ml (sólo en nNOS) y L-[<sup>3</sup>H]-arginina 0.05 µM, manteniendo siempre un pH de 7.6.
- 10 µl de una alícuota de la isoforma de la NOS sobre la que hacemos el estudio.
- 10 µl de una disolución del producto a evaluar en una concentración 10 veces superior a la que queremos ensayar.
- 10 µl de NADPH a 7,5 mM (excepto en los pocillos control).
- Una cantidad suficiente de H<sub>2</sub>O MiliQ para alcanzar los 100 µl.

Todas las muestras se incuban durante 30 minutos a 37 °C.

Transcurrido este tiempo, se adicionan 400  $\mu$ l de un tampón a baja temperatura para frenar el proceso enzimático. Esta disolución contiene ácido *N*-(2-hidroximetil)piperazin-*N'*-(2-etanosulfónico) (HEPES) 0,1 M, ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) 10 mM y L-citrulina 0,175 mg/ml con un pH igual a 5.5.

La repentina bajada de temperatura, el cambio en el pH y la dilución de todos los componentes que se encuentran en el pocillo de reacción, son los principales factores que provocan la detención de la reacción enzimática, además, el EGTA también es capaz de quelar los iones  $\text{Ca}^{2+}$  indispensables para la dimerización y funcionamiento de la enzima.

A continuación, cada una de las muestras se hace pasar a través de una columna con resina Dowex-50W de intercambio iónico ( $\text{Na}^+$ ) para después lavarlas con 1.2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ, perdiendo así alrededor del 98% de la radioactividad.

Finalmente, 50  $\mu$ l de cada una de las réplicas se diluyen en líquido de centelleo Eco Lite (+) para tomar las medidas al día siguiente, una vez se eliminan otros factores capaces de excitar el líquido de centelleo más allá de las emisiones  $\beta$ .

La actividad de la NOS se expresa en picomoles de L-citrulina producidos por mg de proteína al minuto (pM/mg min).

Al trabajar con compuestos radioactivos, estos ensayos se llevaron a cabo en la unidad de Radiofarmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Para el tratamiento estadístico de datos y el cálculo de las  $\text{IC}_{50}$  fue utilizado el programa Prism8 de GraphPad.

### 3.2.2. eNOS

Los ensayos sobre esta isoforma se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de investigación CTS-164 del departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

En este caso, también se trabajó *in vitro*, pero a nivel tisular.

El tejido se obtiene a partir de la sección descendente de la aorta de rata, dividiéndose en anillos que posteriormente se montan en baño para órganos.

El baño está compuesto por una copa exterior de cristal y dos finas varillas de acero inoxidable en forma de L encargadas de sujetar el vaso sanguíneo.

Para registrar la contracción del tejido, estas varillas están conectadas a un transductor de fuerzas isométricas, que a través de un amplificador de señales (Dynamometer UF1, Cibertec, Madrid), permite obtener resultados precisos en una interfaz A/D. La recolección de los datos de tensión contráctil se hicieron en un Power-Lab 800 (AD Instruments, Cibertec, Madrid).

El baño de órganos contenía una solución de Krebs (118 mM de NaCl; 4,75 mM de KCl; 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub>; 2 mM de CaCl<sub>2</sub>; 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 11 mM de glucosa) a 37 °C y con un flujo constante de O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%.

Los anillos aórticos se ajustaron a una tensión de 2 g y se equilibraron durante 90 – 120 min.

A continuación, se forzó la contracción gracias a la adición de fenilefrina a una concentración 1 μM, para poder crear una curva de concentración-respuesta con diferentes cantidades de acetilcolina.

Para evaluar la inhibición de la eNOS, los anillos se lavaron y se incubaron con el compuesto a ensayar, en un vehículo que no interfiriese en el experimento (DMSO), durante 30 min, para añadir posteriormente dosis crecientes de acetilcolina.

Comparando las curvas de concentración-respuesta, principalmente el área bajo la curva (AUC), fue posible calcular el índice de actividad de eNOS.

Los datos se expresan en ± SEM, donde n refleja el número de anillos aórticos de diferentes ratas.

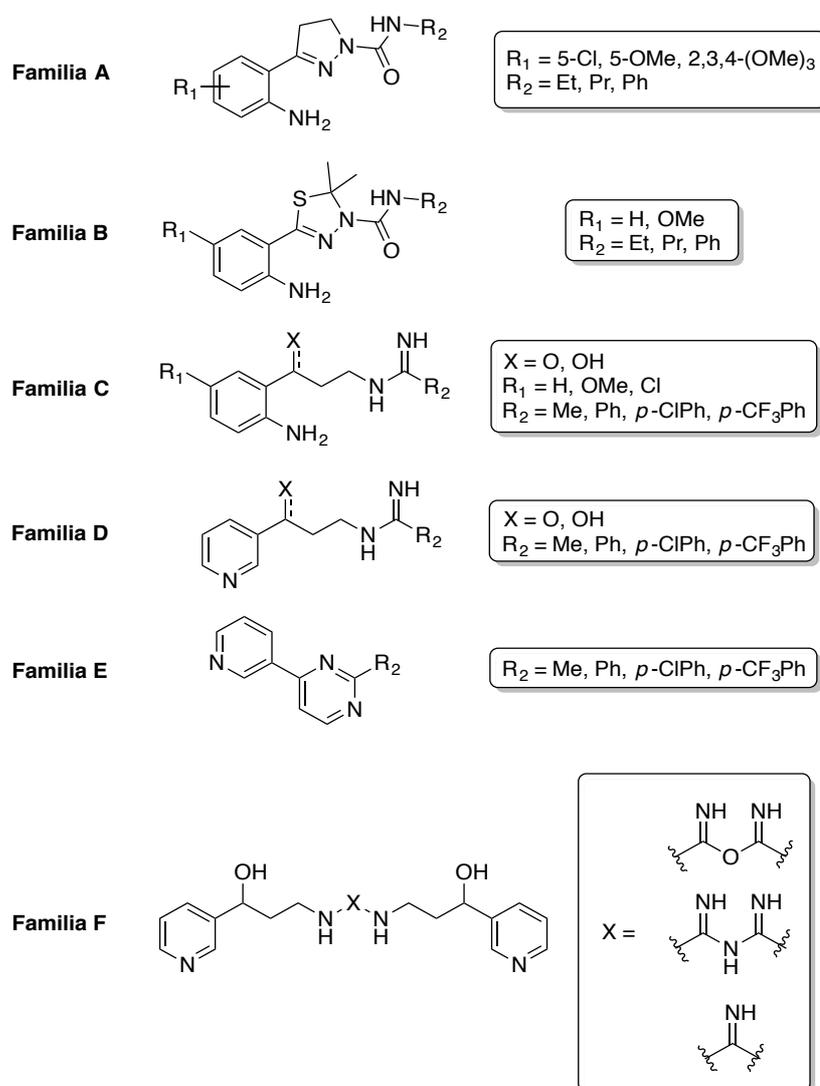
Las ratas sobre las que se ha trabajado son ratas macho Wistar, de Harlan Laboratories (Barcelona, España), con un peso entre 200 y 250 g.



## 4. Resultados y discusión



Se han obtenido cuarenta y un compuestos finales, los cuales se pueden dividir en 6 familias en función de la estructura que presentan (Fig. 36).



**Figura 36.** Estructura general de las diferentes familias de compuestos.

Las familias **A** y **B** engloban un total 13 compuestos, en ambas la función principal es un núcleo de carboxamida, donde el nitrógeno está sustituido por restos de etilo, propilo o fenilo. Sin embargo, la diferencia entre estas familias se encuentra en el anillo heterocíclico unido al carbono 1:

- En la familia **A**, es un anillo de 4,5-dihidro-1*H*-pirazol, sustituido en posición 3 por un resto de 2-aminofenilo.
- En la familia **B**, se trata de un anillo de 2,3-dihidro-1,3,4-tiadiazol, con dos metilos en posición 2 y un sustituyente 2-aminofenilo en posición 5.

Pese a la similitud estructural que presentan estas dos familias, las diferencias en su ruta sintética, al igual que la distinta numeración del anillo intermedio, nos obligan a tratarlas por separado.

Las familias **C** y **D** incluyen 20 compuestos, en estos la función principal es un núcleo de imidamida, con diferentes restos aromáticos o alifáticos en el carbono 2. Además, uno de los nitrógenos está enlazado a una cadena espaciadora propílica y un anillo aromático con diferentes sustituyentes. La diferencia entre estas familias reside en este último anillo aromático: en la familia **C** se trata de un fenilo con un grupo amino en posición 2, mientras que en la familia **D** es un anillo de piridina unido por el C-3. En ambas familias se consideran productos finales tanto los derivados con un grupo hidroxilo en posición 3, como los que tienen en esa misma posición un grupo carbonilo.

La familia **E** está formada por 4 derivados con estructura de piridin-3-ilpirimidina, que resultan de oxidar las piridinas de la familia **D**.

Por último, los 3 miembros de la familia **F**, comprenden los derivados simétricos obtenidos al intentar generar una función guanidina como nexo de unión entre subestructuras de las familias anteriores.

Todos los compuestos que no han sido descritos previamente se han identificado por espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN, ayudándonos de estudios de RMN bidimensional HSQC y HMBC para la determinación inequívoca de los desplazamientos químicos de los átomos de H, C y en ciertas ocasiones N, presentes en estas moléculas.

Las tablas presentes en los apartados de análisis espectroscópico muestran, en primer lugar, los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en ppm y a

continuación, entre paréntesis, está reflejada la multiplicidad de dicha señal y sus correspondientes constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz.

Con el fin de determinar la potencia y selectividad de los compuestos finales sintetizados, todos han sido sometidos a ensayos de inhibición enzimática *in vitro*.

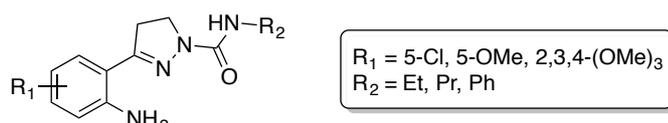
Para las isoformas nNOS e iNOS, en primer lugar, se realizó un cribado a una concentración fija que sirvió para seleccionar los compuestos más prometedores, para los que posteriormente se obtuvieron los valores de  $IC_{50}$ .

En el caso de la isoenzima eNOS, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* a nivel tisular con los candidatos más potentes de cada familia.

## 4.1. Familia A

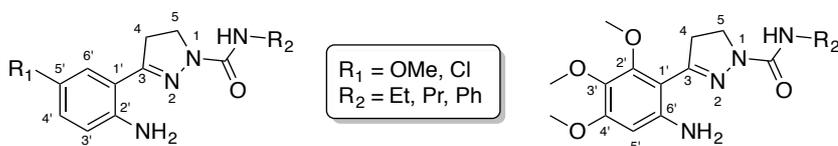
### 4.1.1. Diseño molecular

Esta familia se centra en el desarrollo de análogos rígidos de las estructuras kinurenámicas, una estrategia propuesta en ocasiones anteriores por nuestro grupo de investigación.<sup>158,167</sup>



**Figura 37.** Estructura general de los compuestos finales de la Familia A.

Al reemplazar la cadena propílica espaciadora por un anillo de pirazolina, es posible congelar ciertas conformaciones de la estructura de la melatonina, manteniendo las distancias entre los extremos de la molécula. Este efecto se ve reforzado por la posible creación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno 2 del anillo de pirazol y el grupo amino en posición 2' (6' en el caso de los derivados con tres grupos metoxilo).



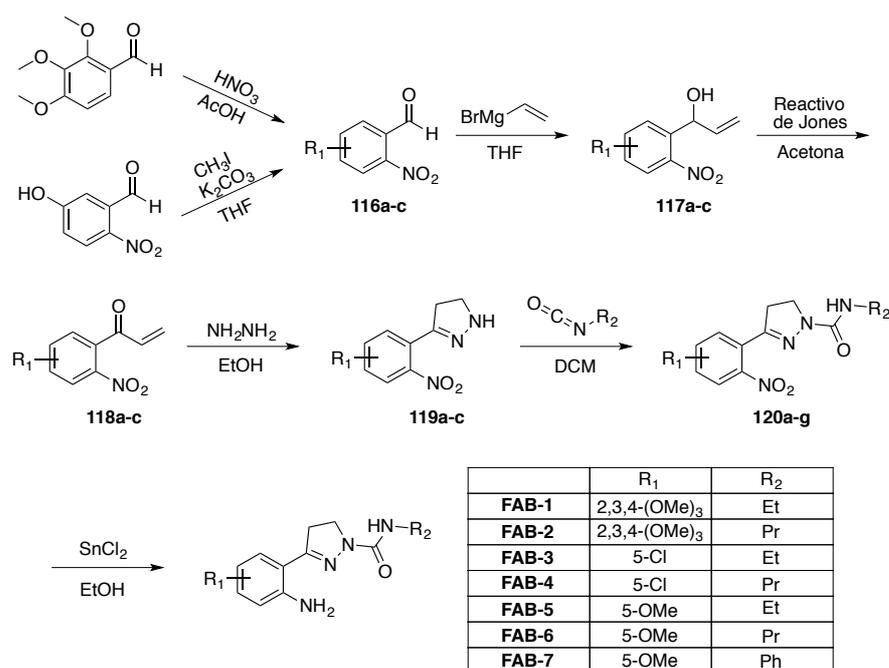
**Figura 38.** Numeración de las estructuras de la familia A.

Por regla general, estos compuestos tienden a presentar una mayor selectividad por iNOS.

Con objeto de estudiar la influencia en la potencia y selectividad, se introdujeron diferentes sustituyentes en el anillo aromático unido a 3 y en el N-1 de la función carboxamídica.

#### 4.1.2. Síntesis química

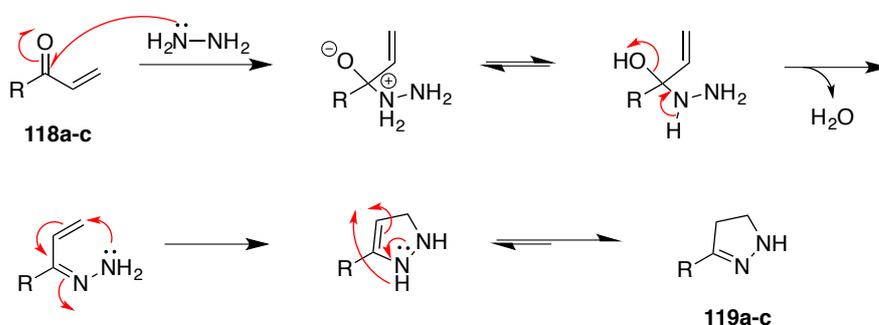
A continuación se describe, de forma general, la ruta sintética elegida para obtener los productos finales de esta familia.



**Esquema 1.** Ruta sintética propuesta para la familia A.

El intermedio sintético en el que confluyen las tres ramas de esta familia es el nitrobenzaldehído **116**. La síntesis de los derivados trimetoxilados comienza con el 2,3,4-trimetoxibenzaldehído que, al someterse a un tratamiento con ácido nítrico y ácido acético, se nitra en posición 6, obteniéndose **116a**. El 5-cloro-2-nitrobenzaldehído **116b** está disponible comercialmente. Para el compuesto con solo un grupo metoxilo, se parte del 5-hidroxi-2-nitrobenzaldehído, que se metila con yoduro de metilo y carbonato potásico en THF, para dar lugar a **116c**.

El siguiente paso consiste en la adición de un resto vinílico al grupo carbonilo, para lo cual se utiliza bromuro de vinilmagnesio en presencia de THF anhidro, obteniendo los alcoholes  $\alpha,\beta$ -insaturados **117a-c**. A continuación, se oxida la función alcohólica con el reactivo de Jones para obtener las cetonas **118a-c**. A partir de aquí, el tratamiento con hidrazina monohidrato conlleva la formación del anillo de 4,5-dihidro-1*H*-pirazol, dando los derivados **119a-c**.



**Esquema 2.** Mecanismo de reacción para la ciclación de pirazolininas.

Con la introducción de los diferentes isocianatos (de etilo, propilo y fenilo), utilizando el microondas, se genera la función principal de los compuestos finales, obteniendo así las carboxamidas **120a-g**. Por último, la reducción del grupo nitro a amino usando cloruro de estaño (II) en etanol, lleva a los compuestos finales **FAB-1 – FAB-7**.

#### 4.1.3. Análisis espectroscópico

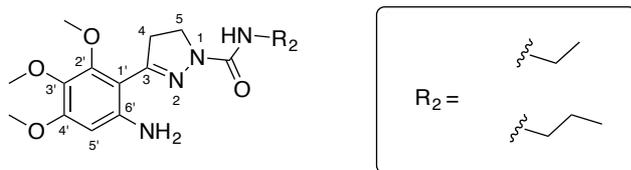
El disolvente utilizado para disolver las muestras fue el cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

La numeración de la estructura común a todos estos compuestos sigue las reglas establecidas por la IUPAC, iniciando en el anillo de pirazolina, continuando con el anillo aromático unido directamente a él y por último los diferentes sustituyentes de  $\text{R}_2$ .

Para facilitar el trabajo, se ha decidido tratar por separado los derivados trimetoxilados por poseer una numeración diferente en el anillo aromático.

Las señales de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN aparecen reflejadas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H}$ -RMN para los compuestos intermedios y finales trimetoxilados de la familia **A**.



	<b>120a</b>	<b>120b</b>	<b>FAB-1</b>	<b>FAB-2</b>
H-4	3.18 (t, 10.3)	3.20 (t, 10.3)	3.35 (m)	3.35 (m)
H-5	4.05 (t, 10.3)	4.03 (t, 10.3)	3.87 (m)	3.88 (m)
H-5'	7.40 (s)	7.39 (s)	6.06 (s)	6.06 (s)
-OCH <sub>3</sub>	3.98 (s) 3.96 (s) 3.89 (s)	3.96 (s) 3.95 (s) 3.88 (s)	3.87 (m) 3.76 (s)	3.88 (m) 3.76 (s)
-CONH-	5.69 (sa)	5.74 (sa)	5.62 (sa)	5.69 (sa)
-NH <sub>2</sub>	-	-		
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	3.11 (m)	-	3.26 (m)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	3.30 (m)	1.50 (m)	3.35 (m)	1.55 (m)
-CH <sub>3</sub>	1.14 (t, 7.2)	0.91 (t, 7.4)	1.17 (t, 7.2)	0.91 (t, 7.4)

Comenzando por el anillo de pirazolona, en el caso de los nitroderivados **120a** y **120b**, pueden observarse dos tripletes asociados a los CH<sub>2</sub> en posiciones 4 ( $\delta$  = 3.20 – 3.18 ppm) y 5 ( $\delta$  = 4.05 – 4.03 ppm), la constante de acoplamiento es  $J$  = 10.3 Hz en todos los casos. En los compuestos finales **FAB-1** y **FAB-2** las señales son multipletes, H-4 a  $\delta$  = 3.35 y H-5 a  $\delta$  = 3.88.

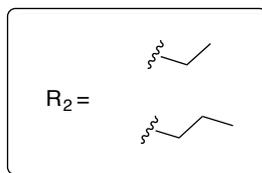
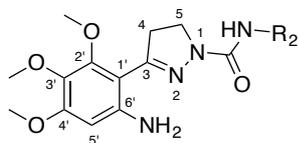
En el anillo aromático solo existe un protón: H-5' que aparece como singlete entre  $\delta$  = 7.40 – 7.39 ppm en **120a** y **120b**; y algo más apantallado ( $\delta$  = 6.06 ppm) en **FAB-1** y **FAB-2**.

Los tres grupos metoxilo del anillo aromático se identifican con tres singletes comprendidos entre  $\delta$  = 3.98 – 3.76 ppm, pudiendo coincidir con el multiplete que genera H-5 en **FAB-1** y **FAB-2**.

El protón de la función carboxamida aparece como singlete ancho con  $\delta = 5.74 - 5.62$  ppm en toda la familia, con la peculiaridad de que en **FAB-1** y **FAB-2**, esta señal incluye a su vez los dos protones del grupo amino.

En relación a los sustituyentes de  $R_2$ , el resto de etilo presente en **120a** y **FAB-1** muestra el  $-CH_3$  terminal como un triplete a  $\delta = 1.17 - 1.14$  ppm y  $J = 7.2$  Hz; el  $CH_2$  sin embargo es un multiplete con  $\delta = 3.35 - 3.30$  ppm. El propilo de **120b** y **FAB-2** presenta el  $-CH_3$  terminal como un triplete  $\delta = 0.91$  ppm con  $J = 7.4$  Hz; un  $CH_2$  intermedio como multiplete a  $\delta = 1.55 - 1.50$  ppm y el  $CH_2$  directamente unido al nitrógeno como multiplete a  $\delta = 3.26 - 3.11$  ppm.

**Tabla 2.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}C$ -RMN para los compuestos intermedios y finales trimetoxilados de la familia A.



	<b>120a</b>	<b>120b</b>	<b>FAB-1</b>	<b>FAB-2</b>
-CONH-	153.7	153.6	155.1 <sup>a</sup>	155.1 <sup>a</sup>
C-3	155.2	155.9	155.3 <sup>a</sup>	155.4 <sup>a</sup>
C-4	37.7	36.2	34.9	36.4
C-5	45.1	44.9	43.6	43.7
C-1'	116.6	116.4	102.8	102.9
C-2'	143.6	143.6	153.6	153.6
C-3'	149.1	149.4	134.2	134.3
C-4'	152.4	152.3	154.0	154.0
C-5'	104.1	104.1	95.1	95.2
C-6'	146.5	146.5	142.9	142.8
-OCH <sub>3</sub>	62.0 61.0 56.5	62.1 61.1 56.8	61.2 61.0 55.7	61.2 61.0 55.7
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	41.8	-	41.8
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	36.4	23.2	36.4	23.6
-CH <sub>3</sub>	15.3	11.2	15.8	11.3

<sup>a</sup> Las señales marcadas pueden considerarse intercambiables.

Los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estos compuestos muestran los siguientes picos:

A campo más alto aparecen las señales del grupo carboxamida y el carbono cuaternario C-3 a  $\delta = 155.9 - 153.6$  ppm, siendo indistinguibles la una de la otra. Los otros dos carbonos del anillo pirazolínico se encuentran entre  $\delta = 37.7 - 34.9$  ppm en C-4 y  $\delta = 45.1 - 43.6$  ppm en C-5.

El anillo aromático presenta desplazamientos bastante diferentes en función del sustituyente en 2'. En los precursores **120a** y **120b**, C-1' ( $\delta = 116.6 - 116.4$  ppm), C-3' ( $\delta = 149.4 - 149.1$  ppm), C-5' ( $\delta = 104.1$  ppm) y C-6' ( $\delta = 146.5$  ppm) están más desapantallados que los de **FAB-1** y **FAB-2**, C-1' ( $\delta = 102.9 - 102.8$  ppm), C-3' ( $\delta = 134.3 - 134.2$  ppm), C-5' ( $\delta = 95.2 - 95.1$  ppm) y C-6' ( $\delta = 142.9 - 142.8$  ppm); en C-2' ocurre lo contrario, siendo  $\delta = 143.6$  ppm en **120a** y **120b**, mientras que en **FAB-1** y **FAB-2** es  $\delta = 153.6$  ppm. C-4' es estable a pesar del cambio de grupo funcional, con  $\delta = 154.0 - 152.3$  ppm.

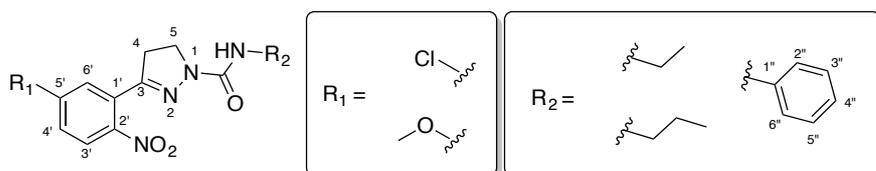
Los tres metoxilos de estas moléculas aparecen en un rango de  $\delta = 62.1 - 55.7$  ppm.

Los carbonos de los sustituyentes de R<sub>2</sub> se pueden dividir entre los de los restos etilo (**120a** y **FAB-1**), donde el CH<sub>2</sub> aparece con  $\delta = 36.4$  ppm y el CH<sub>3</sub> con  $\delta = 15.3$  ppm, y los del propilo (**120b** y **FAB-2**) donde el CH<sub>2</sub> más próximo al nitrógeno tiene  $\delta = 41.8$  ppm, el CH<sub>2</sub> intermedio  $\delta = 23.6 - 23.2$  ppm y el CH<sub>3</sub> terminal  $\delta = 11.3 - 11.2$  ppm.

Los precursores **120c - 120g** serán los siguientes compuestos a discutir. Las señales que aparecen en sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se han recogido en la tabla 3.

Comenzando con el anillo de pirazolina, los dos pares de protones aparecen como tripletes, H-4 a  $\delta = 3.13 - 3.05$  ppm y H-5 a  $\delta = 4.08 - 3.98$  ppm, con constantes de acoplamiento idénticas comprendidas entre  $J = 10.4 - 10.2$  Hz.

**Tabla 3.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H}$ -RMN para los productos intermedios **120c** – **120g**.



	<b>120c</b>	<b>120d</b>	<b>120e</b>	<b>120f</b>	<b>120g</b>
H-4	3.12 (t, 10.2)	3.05 (t, 10.4)	3.10 (t, 10.4)	3.11 (t, 10.4)	3.13 (t, 10.3)
H-5	4.05 (t, 10.2)	3.98 (t, 10.4)	4.05 (t, 10.4)	4.05 (t, 10.4)	4.08 (t, 10.3)
H-3'	7.78 (d, 8.6)	7.69 (d, 8.6)	8.03 (d, 8.9)	8.02 (d, 8.9)	8.01 (d, 8.8)
H-4'	7.51 (m)	7.43 (m)	6.99 (dd, 8.9, 2.7)	6.99 (dd, 9.0, 2.7)	6.97 (m)
H-6'			6.97 (d, 2.7)	6.97 (d, 2.7)	
-CONH-	5.78 (sa)	5.76 (sa)	5.81 (sa)	5.86 (sa)	7.80 (s)
-OCH <sub>3</sub>	-	-	3.92 (s)	3.92 (s)	3.88 (s)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	3.19 (m)	-	3.25 (m)	-
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	3.34 (m)	1.50 (m)	3.33 (m)	1.55 (m)	-
-CH <sub>3</sub>	1.19 (t, 7.2)	0.88 (t, 7.4)	1.17 (t, 7.2)	0.93 (t, 7.4)	-
H-2'', H-6''	-	-	-	-	7.43 (d, 7.6)
H-3'', H-5''	-	-	-	-	7.23 (m)
H-4''	-	-	-	-	6.97 (m)

El anillo aromático se ve influenciado por el sustituyente que presenta en posición 5', en el caso de los 5-cloro derivados **120c** y **120d** la señal de 3' aparece como un doblete a  $\delta = 7.78 - 7.69$  ppm y  $J = 8.6$  Hz, mientras que las otras dos señales de H-4' y H-6' colapsan formando un multiplete de  $\delta = 7.51 - 7.43$  ppm. En los 5-metoxi derivados **120e** – **120g**, la señal de 3' aparece a  $\delta = 8.03 - 8.01$  ppm como un doblete de  $J = 9.0 - 8.8$  Hz por su acoplamiento con H-4', la señal de H-4' aparece como un doblete en **120e** y **120f** a  $\delta = 6.99$  ppm y dos constantes de acoplamiento  $J = 9.0 - 8.9$  Hz con H-3' y  $J = 2.7$  Hz con H-6', la señal de H-6', por tanto, aparece como un doblete a  $\delta = 6.97$  ppm y  $J = 2.7$  Hz por su acoplamiento con H-4'. En

**120g** estas dos últimas señales aparecen juntas en forma de multiplete a  $\delta = 6.97$  ppm.

El protón presente en el grupo carboxamida aparece en el espectro en forma de singlete ancho con un  $\delta = 5.86 - 5.76$  ppm, salvo para **120g**, porque debido al efecto que genera el anillo aromático, la señal se detecta a  $\delta = 7.80$  ppm en forma de singlete.

El grupo metoxilo de **120e - 120g** se reconoce fácilmente como un singlete a  $\delta = 3.92 - 3.88$  ppm.

Los diferentes sustituyentes de R<sub>2</sub> presentan unos valores muy similares a los vistos anteriormente:

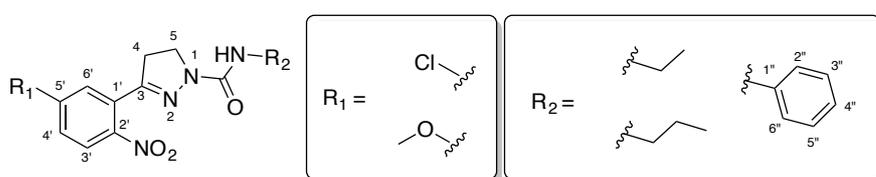
El resto de etilo presente en **120c** y **120e** muestra el -CH<sub>3</sub> terminal como un triplete a  $\delta = 1.19 - 1.17$  ppm y  $J = 7.2$  Hz; el CH<sub>2</sub> sin embargo es un multiplete con  $\delta = 3.34 - 3.33$  ppm. El propilo de **120d** y **120f** presenta el -CH<sub>3</sub> terminal como un triplete a  $\delta = 0.93 - 0.88$  ppm, con  $J = 7.4$  Hz; un CH<sub>2</sub> intermedio como multiplete a  $\delta = 1.55 - 1.50$  ppm y el CH<sub>2</sub> directamente unido al nitrógeno como multiplete a  $\delta = 3.25 - 3.19$  ppm. Por último, el resto de fenilo de **120g** refleja tres señales en el espectro: un doblete a  $\delta = 7.43$  ppm correspondiente a H-2'' y H-6'', un multiplete a  $\delta = 7.23$  ppm correspondiente a H-3'' y H-5'' y otro multiplete a  $\delta = 6.97$  ppm de H-4''.

Las señales de los espectros de <sup>13</sup>C-RMN para estos compuestos son las que aparecen en la tabla 4.

Los tres carbonos del anillo de pirazolina aparecen en el siguiente orden: a campo más alto C-3, diferenciando entre 5-cloro derivados con  $\delta = 148.0 - 147.9$  ppm y 5-metoxi derivados con  $\delta = 155.5 - 152.6$  ppm; a continuación, C-5 a  $\delta = 45.5 - 45.2$  ppm y C-4 a  $\delta = 35.2 - 33.4$  ppm.

Los 5-cloro derivados **120c** y **120d** presentan el carbono carboxamídico a  $\delta = 154.9 - 154.8$  ppm. En el anillo aromático los carbonos cuaternarios pueden encontrarse a  $\delta = 128.2 - 128.1$  ppm C-1', a  $\delta = 146.7 - 146.6$  ppm C-2' y a  $\delta = 138.7$  ppm C-5'; los carbonos aromáticos C-4' y C-6' son indistinguibles al ser dos señales a  $\delta = 129.9$  ppm y  $\delta = 129.8$  ppm; por otra parte, C-3' aparece a  $\delta = 125.5$  ppm.

**Tabla 4.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos intermedios **120c** – **120g**.



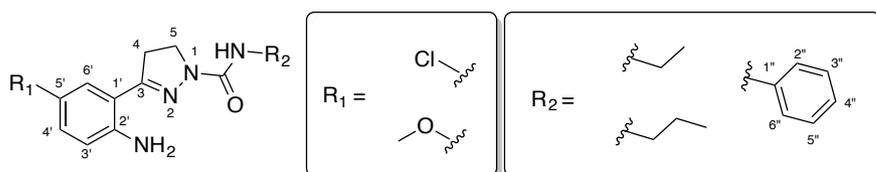
	<b>120c</b>	<b>120d</b>	<b>120e</b>	<b>120f</b>	<b>120g</b>
C-3	148.0	147.9	155.5	155.5	152.6
C-4	33.5	33.4	34.9	34.8	35.2
C-5	45.4	45.4	45.5	45.5	45.2
C-1'	128.2	128.1	130.5	130.4	130.1
C-2'	146.7	146.6	141.4	141.4	141.3
C-3'	125.5	125.5	127.4	127.3	127.5
C-4'	129.9 <sup>a</sup>	129.9 <sup>a</sup>	114.7	114.7	114.9
C-5'	138.7	138.7	151.4	151.4	152.3
C-6'	129.8 <sup>a</sup>	129.8 <sup>a</sup>	115.8	115.8	116.0
-CONH-	154.8	154.9	163.2	163.2	163.3
-OCH <sub>3</sub>	-	-	56.3	56.3	56.3
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	41.8	-	42.0	-
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	35.0	23.4	35.1	23.6	-
-CH <sub>3</sub>	15.5	11.3	15.7	11.5	-
C-1''	-	-	-	-	138.5
C-2'', C-6''	-	-	-	-	129.1
C-3'', C-5''	-	-	-	-	119.1
C-4''	-	-	-	-	123.1

<sup>a</sup> Las señales marcadas pueden considerarse intercambiables.

Los 5-metoxi derivados **120e** – **120g** presentan el carbono carboxamídico a  $\delta = 163.3$  –  $163.2$  ppm. En el anillo aromático, los carbonos cuaternarios pueden encontrarse a  $\delta = 130.5$  –  $130.1$  ppm C-1', a  $\delta = 141.4$  –  $141.3$  ppm C-2' y C-5' a  $\delta = 152.3$  –  $151.4$  ppm; el resto de carbonos son C-3'  $\delta = 127.5$  –  $127.3$  ppm, C-4'  $\delta = 114.9$  –  $114.7$  ppm y C-6'  $\delta = 116.0$  –  $115.8$  ppm. El grupo metoxilo de estos derivados aparece con  $\delta = 56.3$  ppm.

Los carbonos de los sustituyentes de R<sub>2</sub> se pueden dividir entre los restos etilo (**120c** y **120e**), donde el CH<sub>2</sub> aparece con  $\delta = 35.1 - 35.0$  ppm y el CH<sub>3</sub> con  $\delta = 15.7 - 15.5$  ppm; los del propilo (**120d** y **120f**), donde el CH<sub>2</sub> más próximo al nitrógeno tiene  $\delta = 42.0 - 41.8$  ppm, el CH<sub>2</sub> intermedio  $\delta = 23.6 - 23.4$  ppm y el CH<sub>3</sub> terminal  $\delta = 11.5 - 11.3$  ppm y, por último, el fenilo de **120g** con cuatro señales: C-1'' a  $\delta = 138.5$  ppm, C-2'' y C-6'' a  $\delta = 129.1$  ppm, C-3'' y C-5'' a  $\delta = 119.1$  ppm y C-4'' a  $\delta = 123.1$  ppm.

**Tabla 5.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de <sup>1</sup>H-RMN para los productos finales **FAB-3 – FAB-7**.



	<b>FAB-3</b>	<b>FAB-4</b>	<b>FAB-5</b>	<b>FAB-6</b>	<b>FAB-7</b>
H-4	3.27 (t, 10.2)	3.27 (m)	3.27 (t, 10.1)	3.28 (m)	3.36 (t, 10.3)
H-5	3.96 (t, 10.2)	3.95 (t, 10.4)	3.93 (t, 10.1)	3.93 (t, 10.1)	4.02 (t, 10.3)
H-3'	6.68 (d, 8.6)	6.68 (d, 8.6)	6.71 (d, 8.8)	6.71 (d, 8.8)	6.75 (d, 8.8)
H-4'	7.12 (dd, 8.6, 2.4)	7.11 (dd, 8.6, 2.3)	6.83 (dd, 8.8, 2.8)	6.82 (dd, 8.8, 2.8)	6.87 (dd, 8.8, 2.8)
H-6'	7.14 (d, 2.4)	7.15 (d, 2.3)	6.74 (d, 2.8)	6.74 (d, 2.8)	6.78 (d, 2.8)
-CONH-	5.54 (sa)	5.59 (sa)	5.62 (sa)	5.66 (sa)	7.64 (s)
-NH <sub>2</sub>			5.20 (sa)	5.22 (sa)	5.27 (sa)
-OCH <sub>3</sub>	-	-	3.76 (s)	3.76 (s)	3.88 (s)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	3.27 (m)	-	3.28 (m)	-
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	3.37 (m)	1.59 (m)	3.37 (m)	1.57 (m)	-
-CH <sub>3</sub>	1.20 (t, 7.2)	0.95 (t, 7.4)	1.19 (t, 7.2)	0.94 (t, 7.4)	-
H-2'', H-6''	-	-	-	-	7.49 (dt, 8.1, 1.1)
H-3'', H-5''	-	-	-	-	7.31 (dd, 8.1, 7.5)
H-4''	-	-	-	-	7.05 (tt, 7.5, 1.1)

Pasamos al estudio de las señales de <sup>1</sup>H-RMN en los productos finales **FAB-3 – FAB-7** (Tabla 5).

El anillo de pirazolina sigue mostrando dos señales, los hidrógenos H-5 aparecen como un triplete a  $\delta = 4.08 - 3.93$  ppm, con  $J = 10.4 - 10.1$  Hz y los de H-4 aparecen como triplete en **FAB-3**, **FAB-5** y **FAB-7** a  $\delta = 3.36 - 3.27$  ppm, con  $J = 10.3 - 10.1$  Hz idéntica a la de H-5; en **FAB-4** y **FAB-6** aparecen como multipletes a  $\delta = 3.28 - 3.27$  ppm por colapsar con una señal del resto de propilo.

El anillo aromático común a todos estos compuestos tiene tres protones, el que se encuentra en posición 3' aparece como un doblete a  $\delta = 6.75 - 6.68$  ppm, con  $J = 8.8 - 8.6$  Hz por su acoplamiento con H-4'; el protón en posición 4' aparece como doblete, pero su desplazamiento químico varía en función del sustituyente en 5': en los 5-cloro derivados es  $\delta = 7.12 - 7.11$  ppm, con  $J = 8.6$  Hz para H-3' y  $J = 2.4 - 2.3$  Hz para H-6', mientras que en los 5-metoxi derivados es  $\delta = 6.87 - 6.82$  ppm, con  $J = 8.8$  Hz para H-3' y  $J = 2.8$  Hz para H-6'. Finalmente, queda por discernir la señal de H-6', un doblete de  $\delta = 7.15 - 7.14$  ppm y  $J = 2.4 - 2.3$  Hz en **FAB-3** y **FAB-4**, y  $\delta = 6.78 - 6.74$  ppm y  $J = 2.8$  Hz en **FAB-5 - FAB-7**.

Los tres hidrógenos del grupo metoxilo de **FAB-5 - FAB-7** se observan como un singlete con  $\delta = 3.88 - 3.76$  ppm.

El hidrógeno de la función carboxamida aparece como un singlete ancho que, en el caso de **FAB-3** y **FAB-4**, tiene el mismo desplazamiento químico que el grupo amino:  $\delta = 5.59 - 5.54$  ppm; en **FAB-5** y **FAB-6** aparece a  $\delta = 5.66 - 5.62$  ppm y en **FAB-7**, debido a la influencia del fenilo, es de  $\delta = 7.64$  ppm.

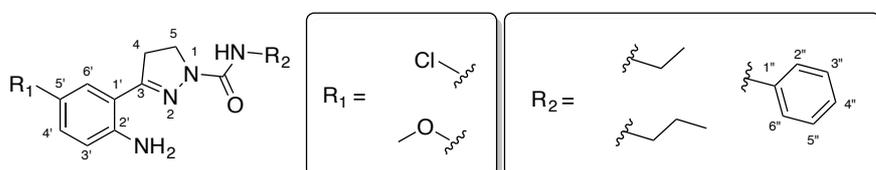
Los protones del grupo amino de **FAB-5 - FAB-7** aparecen como singlete ancho con  $\delta = 5.27 - 5.20$  ppm.

Los diferentes sustituyentes de R<sub>2</sub> presentan unos valores muy similares a los vistos anteriormente:

El resto de etilo presente en **FAB-3** y **FAB-5** muestra el -CH<sub>3</sub> terminal como un triplete a  $\delta = 1.20 - 1.19$  ppm y  $J = 7.2$  Hz; el CH<sub>2</sub> sin embargo, es un multiplete con  $\delta = 3.37$  ppm. El propilo de **FAB-4** y **FAB-6** presenta el -CH<sub>3</sub> terminal como un triplete a  $\delta = 0.95 - 0.94$  ppm, con  $J = 7.4$  Hz; un CH<sub>2</sub> intermedio como multiplete a  $\delta = 1.59 - 1.57$  ppm y el CH<sub>2</sub> directamente unido al nitrógeno como multiplete a  $\delta = 3.28 - 3.27$  ppm. Por último, el resto de fenilo de **FAB-7** refleja tres señales en el espectro: un doble triplete a  $\delta = 7.49$  ppm correspondiente a H-2'' y H-6'', con constantes de acoplamiento  $J = 8.1$  Hz con H-3'' y H-5'', y  $J = 1.1$  Hz con H-4'' y, finalmente,

un doble doblete a  $\delta = 7.31$  ppm correspondiente a H-3'' y H-5'' con constantes de acoplamiento  $J = 8.1$  Hz con H-2'' y H-6'' y  $J = 7.5$  Hz con H-4'' y un triple triplete a  $\delta = 7.05$  ppm de H-4'', con constantes de acoplamiento  $J = 7.5$  Hz con H-3'' y H-5'' y  $J = 1.1$  Hz con H-2'' y H-6''.

**Tabla 6.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos finales **FAB-3 – FAB-7**.



	<b>FAB-3</b>	<b>FAB-4</b>	<b>FAB-5</b>	<b>FAB-6</b>	<b>FAB-7</b>
C-3	153.0	153.5	154.5	154.4	152.0
C-4	33.3	33.5	33.9	33.9	34.2
C-5	43.1	43.4	43.4	43.5	43.2
C-1'	114.9	115.2	114.9	115.0	114.6
C-2'	144.4	144.6	140.6	140.5	140.6
C-3'	116.9	117.2	117.4 <sup>a</sup>	117.3	117.6
C-4'	130.0	130.8	117.4 <sup>a</sup>	117.4	117.9
C-5'	121.3	121.6	151.5	151.5	151.6
C-6'	128.3	128.5	114.2	114.2	114.3
-CONH-	154.6	154.9	155.1	155.2	155.4
-OCH <sub>3</sub>	-	-	56.1	56.1	56.2
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	41.9	-	42.0	-
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	34.8	23.6	35.2	23.8	-
-CH <sub>3</sub>	15.5	11.3	15.9	11.5	-
C-1''	-	-	-	-	138.5
C-2'', C-6''	-	-	-	-	129.1
C-3'', C-5''	-	-	-	-	119.1
C-4''	-	-	-	-	123.3

<sup>a</sup> Las señales marcadas pueden considerarse intercambiables.

Los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estos compuestos muestran las siguientes señales:

El anillo de pirazolina cuenta con tres carbonos, siendo C-3 el más desapantallado, con  $\delta = 154.5 - 152.0$  ppm, el CH<sub>2</sub> de C-4 aparece a  $\delta = 34.2 - 33.3$  ppm y C-5 a  $\delta = 43.5 - 43.1$  ppm.

El carbono de la función carboxamídica unida al nitrógeno en posición 1 muestra una señal de  $\delta = 155.4 - 154.6$  ppm.

En el anillo aromático, apenas varían las señales, correspondiendo C-1' con  $\delta = 115.2 - 114.6$  ppm, C-2' con  $\delta = 144.6 - 140.5$  ppm y C-3' con  $\delta = 117.6 - 116.9$  ppm, en todos los productos.

Los 5-metoxi derivados presentan C-3' y C-4' en el mismo rango de ppm ( $\delta = 117.9 - 117.3$  ppm), lo que hace a estos dos carbonos indistinguibles, C-5' tiene  $\delta = 151.6 - 151.5$  ppm y C-6'  $\delta = 114.3 - 114.2$  ppm.

Para los 5-cloro derivados, C-4' aparece con  $\delta = 130.8 - 130.0$  ppm, C-5' con  $\delta = 121.6 - 121.3$  ppm y C-6' con  $\delta = 128.5 - 128.3$  ppm.

El carbono del grupo metoxilo se encuentra entre  $\delta = 56.2 - 56.1$  ppm.

Los carbonos de los sustituyentes de R<sub>2</sub> se pueden dividir entre los restos de etilo (**FAB-3** y **FAB-5**), donde el CH<sub>2</sub> aparece con  $\delta = 35.2 - 34.8$  ppm y el CH<sub>3</sub> con  $\delta = 15.9 - 15.5$  ppm; los del propilo (**FAB-4** y **FAB-6**), donde el CH<sub>2</sub> más próximo al nitrógeno tiene  $\delta = 42.0 - 41.9$  ppm, el CH<sub>2</sub> intermedio  $\delta = 23.8 - 23.6$  ppm y el CH<sub>3</sub> terminal  $\delta = 11.5 - 11.3$  ppm, y el fenilo de **FAB-7** con cuatro señales: C-1'' a  $\delta = 138.5$  ppm, C-2'' y C-6'' a  $\delta = 129.1$  ppm, C-3'' y C-5'' a  $\delta = 119.1$  ppm y C-4'' a  $\delta = 123.3$  ppm.

#### 4.1.4. Estudios biológicos

Siguiendo el protocolo de Brecht & Snyder, que se ha detallado en el apartado experimental de esta tesis, los siete compuestos finales de esta familia fueron testados como inhibidores de las isoformas inducible y neuronal de la NOS.

Como puede apreciarse en la tabla 7, los porcentajes de inhibición a 1 mM para iNOS se sitúan entre 11.34% y 76.86%, mientras que para nNOS están entre 2.27% y 31.77%, lo que demuestra que, en general, los compuestos de esta familia inhiben con mayor potencia la isoforma inducible.

Del mismo modo, también se puede observar que los derivados con un radical propílico en R<sub>2</sub> dan lugar a una mayor inhibición que el resto de sustituyentes.

**Tabla 7.** Porcentajes de inhibición a concentración 1 mM de la familia **A**.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	% inhibición iNOS	% inhibición nNOS
<b>FAB-1</b>	2,3,4-(OMe) <sub>3</sub>	Et	32.16 ± 2.03	19.97 ± 0.21
<b>FAB-2</b>	2,3,4-(OMe) <sub>3</sub>	Pr	76.86 ± 0.21	31.77 ± 0.82
<b>FAB-3</b>	5-Cl	Et	13.93 ± 1.92	2.27 ± 1.27
<b>FAB-4</b>	5-Cl	Pr	61.97 ± 1.20	30.48 ± 2.21
<b>FAB-5</b>	5-OMe	Et	38.42 ± 1.61	12.79 ± 1.24
<b>FAB-6</b>	5-OMe	Pr	40.68 ± 2.48	17.69 ± 1.93
<b>FAB-7</b>	5-OMe	Ph	11.34 ± 1.39	22.70 ± 2.78

Para las moléculas con mejores porcentajes de inhibición iNOS se calcularon los valores de IC<sub>50</sub>, cuyos resultados se muestran en la tabla 8. El mejor inhibidor de esta familia es el derivado con tres grupos metoxilo en el anillo bencénico y un resto propílico en R<sub>2</sub> (**FAB-2**), con una selectividad de, aproximadamente, 2.5 veces sobre nNOS.

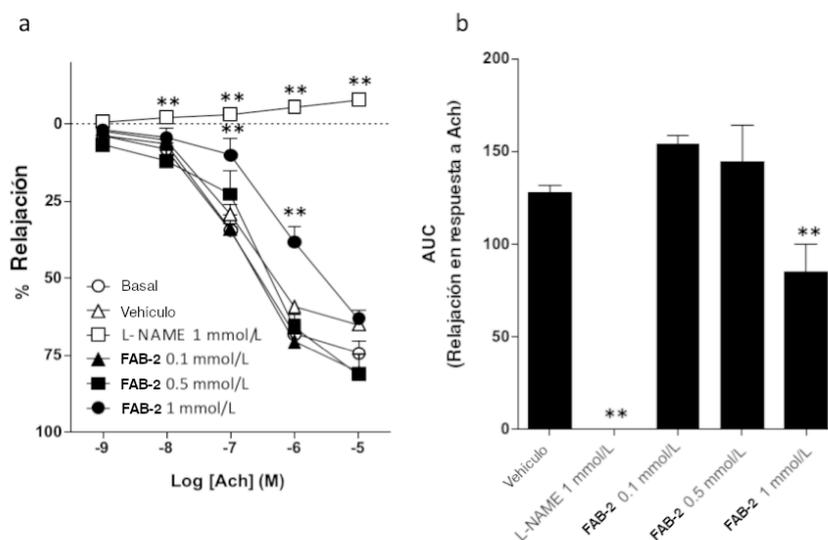
**Tabla 8.** Valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la actividad iNOS de las pirazolinás más potentes.

iNOS	
Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>FAB-2</b>	130
<b>FAB-4</b>	740

A pesar de mostrar bajos niveles de inhibición en nNOS, en estos compuestos se repite un patrón que relaciona la potencia inhibitoria con el sustituyente en R<sub>2</sub>: cuanto mayor es el volumen del mismo, mayor es la potencia inhibitoria.

Una vez finalizado el estudio de las isoformas neuronal e inducible, nos pareció adecuado incluir ensayos biológicos con la isoforma endotelial, siendo el principal objetivo, descartar posibles efectos adversos a nivel circulatorio en el caso de una administración sistémica.

Para ello, seleccionamos el mejor inhibidor de esta familia (**FAB-2**) y fue sometido al ensayo descrito en el apartado 3.2.2. utilizando anillos aórticos de rata con el endotelio intacto.



**Figura 39.** Efectos de **FAB-2** sobre la actividad de eNOS.<sup>168</sup>

Los gráficos representados en la figura 39 muestran los resultados de estas experiencias.

El primero de ellos (a) compara el porcentaje de relajación a medida que se aumenta la concentración de Ach en:

- Tres concentraciones diferentes de **FAB-2** (1 mM, 0.5 mM y 0.1 mM).
- L-NAME a una concentración de 1 mM (inhibidor conocido de eNOS).
- El vehículo (DMSO) en el que se disuelven los compuestos a ensayar.

Mientras L-NAME mantuvo una contracción máxima a lo largo de todo el experimento, tanto el vehículo como las dos concentraciones más bajas de **FAB-2**, no mostraron alteraciones a la respuesta basal. No obstante, a 1 mM, **FAB-2** inhibió significativamente la relajación inducida por Ach.

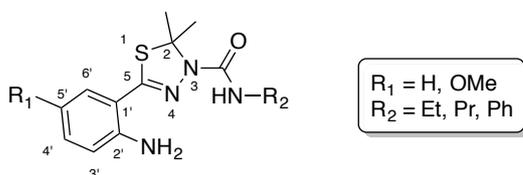
Cuando se midió el área bajo la curva (AUC), representada en el segundo gráfico (b), se pudo concretar que el porcentaje de inhibición provocado por **FAB-2** a 1 mM es del 33.1%.

Como conclusión a este experimento, podemos afirmar que en el rango en el que se encuentra la IC<sub>50</sub> de **FAB-2** para iNOS no existe efecto sobre la isoforma endotelial.

## 4.2. Familia B

### 4.2.1. Diseño molecular

Continuando con la estrategia de aumentar la rigidez de la cadena espaciadora, se decidió sustituir el anillo de pirazolina por uno de tiadiazolina, apareciendo así la familia de las 2,2-dimetil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamidas.



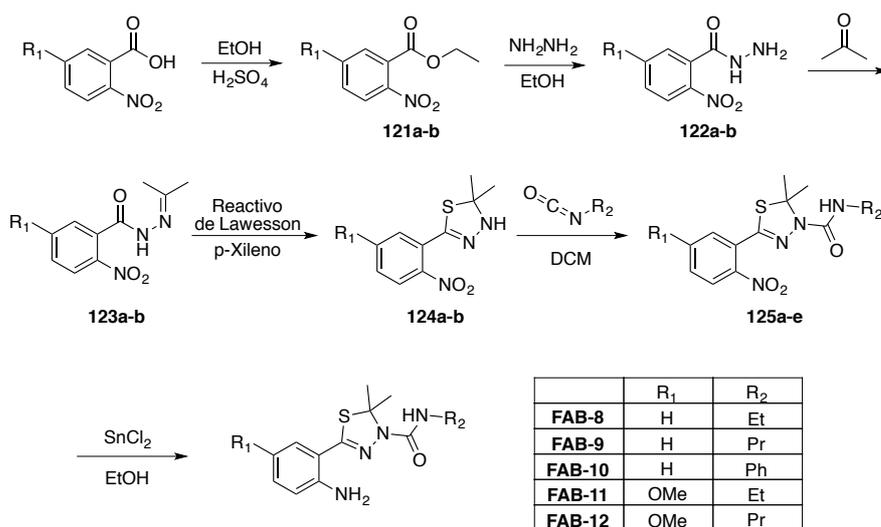
**Figura 40.** Estructura general de los compuestos de la familia **B**.

La explicación para la limitación de la flexibilidad con este cambio proviene del mayor volumen del átomo de azufre respecto al carbono, obligando al ángulo de enlace en ese vértice del anillo a ser más agudo. Si a esto se le une la presencia de dos metilos en el carbono adyacente, esta parte de la molécula se encuentra mucho más tensionada y, por tanto, menos propensa a cambiar de conformación.

En relación a la conformación que podrían adquirir estas moléculas en el lugar de unión a la enzima, no difiere demasiado de la familia anterior, siendo posible, en este caso, la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo amino del anillo aromático y el N-4 del heterocíclico.

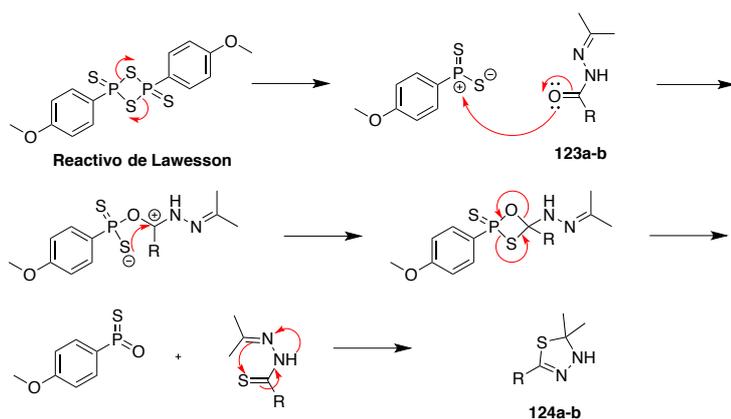
### 4.2.2. Síntesis química

En este caso, los productos de partida son el ácido 2-nitrobenzoico y su derivado 5-metoxilado, ambos de origen comercial, sobre los que se realiza una esterificación con etanol y ácido sulfúrico para obtener **121a-b**. Estos intermedios se someten a un tratamiento con hidrazina en etanol generando las hidrazidas **122a-b**. En presencia de acetona, se adicionará un resto isopropilidénico sobre el nitrógeno menos sustituido, llegando a los intermedios **123a-b**. A continuación, se utiliza el reactivo de Lawesson para ciclar esta estructura, al tiempo que se introduce un átomo de S, dando lugar al anillo de tiadiazol y obteniendo los derivados **124a-b**.



**Esquema 3.** Ruta sintética propuesta para la familia B.

A continuación, se procede a la adición nucleofílica de los diferentes isocianatos de alquilo o arilo, obteniendo **125a-e**. Al igual que en la familia anterior, el último paso consiste en una reducción del grupo nitro a amino con cloruro estannoso, dando lugar a los productos finales **FAB-8 – FAB-12**.



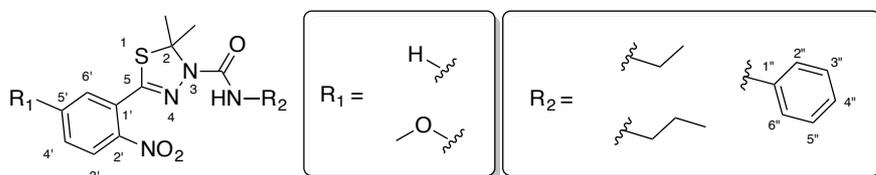
**Esquema 4.** Mecanismo de reacción para la ciclación de las tiadiazolinas.

#### 4.2.3. Análisis espectroscópico

El disolvente utilizado para todos los experimentos fue el cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

La numeración de la estructura común a todos estos compuestos sigue las reglas establecidas por la IUPAC, comenzando por el anillo de tiazazol, continuando con el anillo aromático unido directamente a él y por último los diferentes sustituyentes de R<sub>2</sub>.

**Tabla 9.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de <sup>1</sup>H-RMN para los productos intermedios **125a** – **125e**.



	<b>125a</b>	<b>125b</b>	<b>125c</b>	<b>125d</b>	<b>125e</b>
2x-CH <sub>3</sub>	2.07 (s)	2.05 (s)	2.11 (s)	2.10 (s)	2.09 (s)
H-3'	7.72 (dd, 7.9, 1.3)	7.69 (dd, 7.8, 1.3)	7.74 (dd, 7.8, 1.3)	7.94 (d, 8.9)	7.91 (d, 9.0)
H-4'	7.55 (ddd, 7.9, 7.8, 1.6)	7.53 (ddd, 7.8, 7.7, 1.6)	7.59 (ddd, 7.8, 7.7, 1.6)	7.01 (d, 2.7)	7.00 (d, 2.8)
H-5'	7.60 (ddd, 7.8, 7.6, 1.3)	7.59 (ddd, 7.7, 7.6, 1.3)	7.64 (ddd, 7.7, 7.6, 1.4)	-	-
H-6'	7.52 (dd, 7.6, 1.6)	7.49 (dd, 7.6, 1.5)	7.54 (dd, 7.6, 1.5)	6.99 (s)	6.98 (d, 2.9)
-CONH-	5.82 (sa)	5.88 (sa)	7.91 (sa)	5.88 (sa)	5.93 (sa)
-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	3.92 (s)	3.91 (s)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	3.18 (m)	-	-	3.19 (m)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	3.26 (m)	1.53 (m)	-	3.30 (m)	1.54 (m)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	1.16 (t, 7.3)	0.93 (t, 7.4)	-	1.16 (t, 7.2)	0.92 (t, 7.4)
H-2'', H-6''	-	-	7.49 (dd, 8.6, 1.1)	-	-
H-3'', H-5''	-	-	7.31 (m)	-	-
H-4''	-	-	7.06 (td, 7.4, 1.1)	-	-

En esta familia, el anillo principal consta solamente de los protones presentes en los dos -CH<sub>3</sub> en posición 2, los cuales, al estar tan aislados, aparecen como un único singlete a  $\delta$  = 2.11 – 2.05 ppm.

En el estudio del anillo aromático se aprecian notables diferencias entre los protones de los derivados sin sustitución en posición 5' y los derivados metoxilados.

En **125a** – **125c** la multiplicidad de las señales es mayor, apareciendo H-3' como doble doblete a  $\delta = 7.74 - 7.69$  ppm, con  $J = 7.9 - 7.8$  Hz por su acoplamiento con H-4', y  $J = 1.3$  Hz por su acoplamiento con H-5'. El siguiente protón (H-4') es un doble doblete, con  $\delta = 7.59 - 7.53$  ppm y acoplamientos con H-3' ( $J = 7.9 - 7.8$  Hz), con H-5' ( $J = 7.8 - 7.7$  Hz) y con H-6' ( $J = 1.6$  Hz). A continuación, H-5' resuena a  $\delta = 7.64 - 7.59$  ppm como doble doblete y sus constantes de acoplamiento son  $J = 7.8 - 7.7$  Hz por su acoplamiento con H-4',  $J = 7.6$  Hz por su acoplamiento con H-6', y  $J = 1.4 - 1.3$  Hz por su acoplamiento con H-5'. La última de las señales H-6' es un doble doblete a  $\delta = 7.54 - 7.49$  ppm, al estar acoplado con H-5' ( $J = 7.6$  Hz) y con H-4' ( $J = 1.6 - 1.5$  Hz).

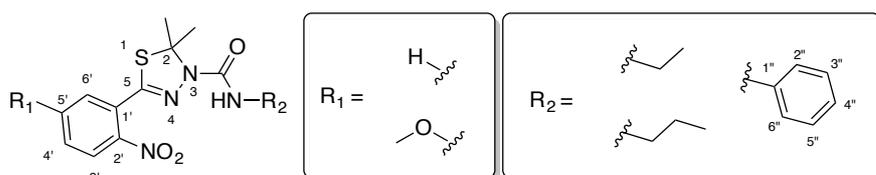
En **125d** y **125e** las señales se identifican como un doblete para H-3' a  $\delta = 7.94 - 7.91$  ppm, con  $J = 9.0 - 8.9$  Hz y las señales de H-4' y H-6' aparecen prácticamente juntas a  $\delta = 7.01 - 6.98$  ppm, complicando su identificación inequívoca. Los protones de los grupos metoxilo en posición 5' aparecen como singletes entre  $\delta = 3.92 - 3.91$  ppm.

El protón perteneciente al grupo carboxamida aparece como singlete ancho en  $\delta = 5.93 - 5.82$  ppm, salvo en el caso de **125c**, donde la influencia del grupo fenilo desplaza la señal hasta  $\delta = 7.91$  ppm.

Los diferentes sustituyentes de R<sub>2</sub> presentan unos valores muy similares a los vistos anteriormente:

El resto de etilo presente en **125a** y **125d** muestra el -CH<sub>3</sub> terminal como un triplete a  $\delta = 1.16$  ppm y  $J = 7.3 - 7.2$  Hz; el CH<sub>2</sub> sin embargo, es un multiplete con  $\delta = 3.30 - 3.26$  ppm. El propilo de **125b** y **125e** presenta el -CH<sub>3</sub> terminal como un triplete  $\delta = 0.93 - 0.92$  ppm con  $J = 7.4$  Hz, un CH<sub>2</sub> intermedio como multiplete a  $\delta = 1.54 - 1.53$  ppm y, finalmente, el CH<sub>2</sub> directamente unido al nitrógeno como multiplete a  $\delta = 3.19 - 3.18$  ppm. Por último, el resto de fenilo de **125c** refleja tres señales en el espectro: un doble doblete a  $\delta = 7.49$  ppm correspondiente a H-2'' y H-6'', con constantes de acoplamiento  $J = 8.6$  Hz con H-3'' y H-5'' y  $J = 1.1$  Hz con H-4'', un multiplete a  $\delta = 7.31$  ppm correspondiente a H-3'' y H-5'', y un triplete a  $\delta = 7.06$  ppm de H-4'', con constantes de acoplamiento  $J = 7.4$  Hz con H-3'' y H-5'' y  $J = 1.1$  Hz con H-2'' y H-6''.

**Tabla 10.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos intermedios **125a** – **125e**.



	<b>125a</b>	<b>125b</b>	<b>125c</b>	<b>125d</b>	<b>125e</b>
2x -CH <sub>3</sub>	29.8	29.8	29.8	29.7	29.7
C-2	82.5	82.5	82.4	82.8	82.7
C-5	140.1	139.9	148.6	141.7 <sup>a</sup>	141.7 <sup>a</sup>
C-1'	124.4	124.2	123.7	127.9	127.8
C-2'	148.6	148.6	141.0	141.2 <sup>a</sup>	141.1a
C-3'	123.9	123.8	123.4	127.1	126.9
C-4'	130.7 <sup>a</sup>	130.6 <sup>a</sup>	130.6	115.3	115.3
C-5'	132.1	132.0	131.0	162.7	162.6
C-6'	130.6 <sup>a</sup>	130.6 <sup>a</sup>	132.1	116.2	116.1
-CONH-	154.6	154.7	151.7	154.8	154.9
-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	56.3	56.3
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	42.0	-	-	42.0
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	35.1	23.3	-	35.1	23.4
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	15.3	11.4	-	15.4	11.5
C-1''	-	-	138.3	-	-
C-2'', C-6''	-	-	119.4	-	-
C-3'', C-5''	-	-	129.1	-	-
C-4''	-	-	123.8	-	-

<sup>a</sup> Las señales marcadas pueden considerarse intercambiables.

Comenzando el estudio de  $^{13}\text{C}$ -RMN por el anillo de triazol, pueden observarse 3 señales, a campo más alto aparece C-5, un carbono cuaternario de  $\delta = 148.6 - 139.9$  ppm, a continuación aparece C-2 con  $\delta = 82.7 - 82.4$  ppm y, por último, los dos metilos unidos a este carbono entre  $\delta = 29.8 - 29.7$  ppm.

Abordaremos por separado el estudio del anillo aromático en función del sustituyente que presentan:

Los compuestos **125a** – **125c** muestran C-1' a  $\delta = 124.4 - 123.7$  ppm, C-2' a  $\delta = 148.6 - 141.0$  ppm, C-3' a  $\delta = 123.9 - 123.4$  ppm y C-5' a  $\delta = 132.1 - 131.0$  ppm. Los carbonos C-4' y C-6' tienen un desplazamiento químico muy similar, comprendido entre  $\delta = 130.7 - 130.6$  ppm, lo que complica su identificación inequívoca.

En el caso de **125d** y **125e**, C-1' aparece a  $\delta = 127.9 - 127.8$  ppm, C-2' a  $\delta = 141.2 - 141.1$  ppm (fácilmente intercambiable por las señales de C-5), C-3' a  $\delta = 127.1 - 126.9$  ppm, C-4' a  $\delta = 115.3$  ppm, C-5' a  $\delta = 162.7 - 162.6$  ppm y C-6' a  $\delta = 116.2 - 116.1$  ppm. La señal del metoxilo unido a C-5' resuena a  $\delta = 56.3$  ppm.

El carbono de la función carboxamida posee un entorno muy similar en todos estos compuestos, lo que le confiere un  $\delta = 154.9 - 151.6$  ppm.

Los carbonos de los sustituyentes de R<sub>2</sub> se pueden dividir entre los restos etilo (**125a** y **125d**), donde el CH<sub>2</sub> aparece con  $\delta = 35.1$  ppm y el CH<sub>3</sub> con  $\delta = 15.4 - 15.3$  ppm; los del propilo (**125b** y **125d**), donde el CH<sub>2</sub> más próximo al nitrógeno tiene  $\delta = 42.0$  ppm, el CH<sub>2</sub> intermedio  $\delta = 23.4 - 23.3$  ppm y el CH<sub>3</sub> terminal  $\delta = 11.5 - 11.4$  ppm, y el fenilo de **125e** con cuatro señales: C-1'' a  $\delta = 138.3$  ppm, C-2'' y C-6'' a  $\delta = 119.4$  ppm, C-3'' y C-5'' a  $\delta = 129.1$  ppm y C-4'' a  $\delta = 123.8$  ppm.

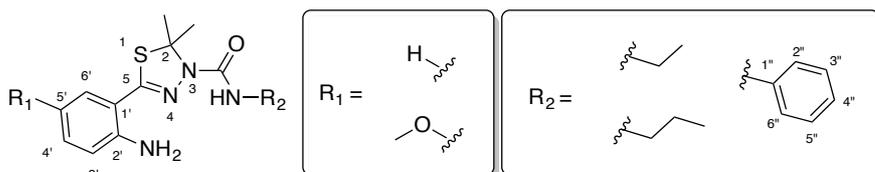
La tabla 11 contiene las señales que presentan espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los productos finales de esta familia.

El anillo de tiadiazol muestra las señales de los dos metilos como un singlete a  $\delta = 2.15 - 2.02$  ppm.

El anillo aromático de **FAB-8** – **FAB-10** muestra sus cuatro protones como dos multipletes, el primero comprendido entre  $\delta = 7.27 - 7.16$  ppm, resultado del colapso de las señales H-4' y H-6'; y el segundo entre  $\delta = 6.80 - 6.71$  ppm, que incluye a H-3' y H-5'.

En **FAB-11** y **FAB-12** las señales aparecen más claras por la ausencia del protón en posición 5': H-3' es un doblete a  $\delta = 6.70$  ppm, acoplado con H-4' ( $J = 8.8$  Hz); H-4' es un doblete a  $\delta = 6.83 - 6.82$  ppm, al estar acoplado con H-3' ( $J = 8.8$  Hz) y con H-6' ( $J = 2.8 - 2.7$  Hz); la última señal es H-6', un doblete a  $\delta = 6.73 - 6.72$  ppm, con  $J = 2.8 - 2.7$  Hz por su acoplamiento con H-4'. El grupo metoxilo en posición 5' se observa como singlete a  $\delta = 3.75$  ppm.

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H-RMN}$  para los productos finales **FAB-8** – **FAB-12**.



	<b>FAB-8</b>	<b>FAB-9</b>	<b>FAB-10</b>	<b>FAB-11</b>	<b>FAB-12</b>
2x-CH <sub>3</sub>	2.02 (s)	2.03 (s)	2.15 (s)	2.03 (s)	2.03 (s)
H-3'	6.71a (m)	6.72a (m)	6.80a (m)	6.70 (d, 8.8)	6.70 (d, 8.8)
H-4'	7.16b (m)	7.17b (m)	7.27b (m)	6.82 (dd, 8.8, 2.7)	6.83 (dd, 8.8, 2.8)
H-5'	6.71a (m)	6.72a (m)	6.80a (m)	-	-
H-6'	7.16b (m)	7.17b (m)	7.27b (m)	6.72 (d, 2.7)	6.73 (d, 2.8)
-CONH-	5.69 (sa)	5.77 (sa)	7.79 (s)	5.74 (sa)	5,80 (sa)
-NH <sub>2</sub>	4.90 (sa)	5.16 (sa)	5.30 (sa)	5.22 (sa)	5,25 (sa)
-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	3.75 (s)	3.75 (s)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	3.24 (m)	-	-	3.24 (m)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	3.31 (m)	1.56 (m)	-	3.32 (m)	1.56 (m)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	1.16 (t, 7.3)	0.94 (t, 7.4)	-	1.17 (t, 7.2)	0.94 (t, 7.4)
H-2'', H-6''	-	-	7.49 (d, 8.6)	-	-
H-3'', H-5''	-	-	7.36 (dd, 8.6, 7.4)	-	-
H-4''	-	-	7.12 (t, 7.4)	-	-

Los protones del grupo amino aparecen en todos los casos como singlete ancho entre  $\delta = 5.30 - 4.90$  ppm.

En el grupo carboxamida, la señal del protón es un singlete ancho a  $\delta = 5.80 - 5.69$  ppm, con la excepción de **FAB-10** donde hablamos de un singlete a  $\delta = 7.79$  ppm.

Los diferentes sustituyentes de  $R_2$  presentan unos valores muy similares a los vistos anteriormente:

El resto de etilo presente en **FAB-8** y **FAB-11** muestra el -CH<sub>3</sub> terminal como un triplete  $\delta = 1.17 - 1.16$  ppm y  $J = 7.3 - 7.2$  Hz; el CH<sub>2</sub> sin embargo, es un multiplete con  $\delta = 3.32 - 3.31$  ppm. El propilo de **FAB-9** y **FAB-12** presenta el -CH<sub>3</sub> terminal como un triplete  $\delta = 0.94$  ppm con  $J = 7.4$  Hz; un CH<sub>2</sub> intermedio como multiplete a  $\delta = 1.56$  ppm y el CH<sub>2</sub> directamente unido al nitrógeno como multiplete a  $\delta = 3.24$  ppm. Por último, el resto de fenilo de **FAB-10** refleja tres señales en el espectro: un doblete a  $\delta = 7.49$  ppm correspondiente a H-2'' y H-6'', acoplándose con  $J = 8.6$  Hz a H-3'' y H-5''; un doblete a  $\delta = 7.36$  ppm correspondiente a H-3'' y H-5'', esta señal se acopla con H-2'' y H-6'' ( $J = 8.6$  Hz) y con H-4'' ( $J = 7.4$  Hz); finalmente observamos un triplete a  $\delta = 7.12$  ppm de H-4'' con constante de acoplamiento  $J = 7.4$  Hz con H-3'' y H-5''.

En los espectros de <sup>13</sup>C-RMN (Tabla 12), el anillo de tiadiazol presenta 3 señales: C-2 aparece a  $\delta = 78.8 - 78.2$  ppm, los dos metilos unidos a este carbono tienen un desplazamiento de  $\delta = 29.8 - 29.5$  ppm y, por último, a campo más alto aparece C-5, un carbono cuaternario de  $\delta = 145.3 - 145.2$  ppm en **FAB-8 - FAB-10** y  $\delta = 152.0 - 151.7$  ppm en **FAB-11** y **FAB-12**.

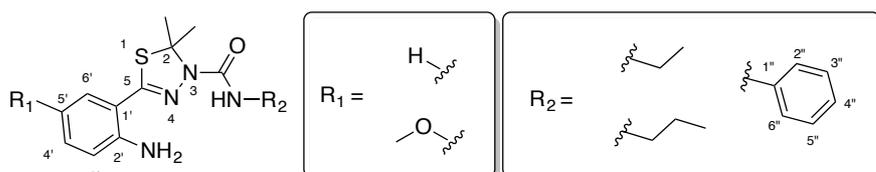
Abordaremos por separado el estudio del anillo aromático en función del sustituyente que presentan:

Los compuestos **FAB-8 - FAB-10** muestran como señales claramente diferenciadas C-1', que aparece a  $\delta = 113.5 - 113.3$  ppm y C-2' a  $\delta = 148.9 - 147.7$  ppm. Los carbonos C-4' y C-6' tienen un desplazamiento químico muy similar comprendido entre  $\delta = 131.4 - 130.7$  ppm, y lo mismo ocurre con C-3' y C-5' a  $\delta = 117.8 - 116.3$  ppm, complicando su identificación inequívoca.

En el caso de **FAB-11** y **FAB-12**, C-1' aparece en  $\delta = 114.7 - 114.4$  ppm, C-2' a  $\delta = 139.7 - 139.4$  ppm, C-3' y C-4' a  $\delta = 118.8 - 117.9$  ppm, C-5' a  $\delta = 147.4 - 147.2$  ppm y C-6' a  $\delta = 114.4 - 114.1$  ppm. La señal del metoxilo unido a C-5' se encuentra a  $\delta = 56.4 - 56.3$  ppm.

El carbono de la función carboxamida posee un entorno muy similar en todos estos compuestos, lo que le confiere un  $\delta = 154.9 - 151.9$  ppm.

**Tabla 12.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos finales **FAB-8** – **FAB-12**.



	<b>FAB-8</b>	<b>FAB-9</b>	<b>FAB-10</b>	<b>FAB-11</b>	<b>FAB-12</b>
2x -CH <sub>3</sub>	29.5	29.5	29.6	29.6	29.8
C-2	78.2	78.2	78.2	78.5	78.8
C-5	145.2	145.3	145.3	151.7	152.0
C-1'	113.5	113.5	113.3	114.4	114.7
C-2'	147.7	147.7	148.9	139.4	139.7
C-3'	116.4 <sup>b</sup>	116.3 <sup>b</sup>	116.5 <sup>b</sup>	117.9	118.2
C-4'	130.7 <sup>a</sup>	130.7 <sup>a</sup>	130.8 <sup>a</sup>	118.5	118.8
C-5'	117.6 <sup>b</sup>	117.6 <sup>b</sup>	117.8 <sup>b</sup>	147.2	147.4
C-6'	131.0 <sup>a</sup>	131.0 <sup>a</sup>	131.4 <sup>a</sup>	114.1	114.4
-CONH-	154.8	154.9	151.9	154.8	155.1
-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	56.4	56.3
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-	42.0	-	-	42.3
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	35.0	23.5	-	35.2	23.4
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	15.6	11.5	-	15.6	11.7
C-1''	-	-	138.2	-	-
C-2'', C-6''	-	-	129.1	-	-
C-3'', C-5''	-	-	119.8	-	-
C-4''	-	-	123.6	-	-

<sup>a,b</sup> Las señales marcadas con la misma letra pueden considerarse intercambiables.

Los carbonos de los sustituyentes de R<sub>2</sub> se pueden dividir entre los restos de etilo (**FAB-8** y **FAB-11**), donde el CH<sub>2</sub> aparece con  $\delta$  = 35.2 – 35.0 ppm y el CH<sub>3</sub> con  $\delta$  = 15.6 ppm, los del propilo (**FAB-9** y **FAB-12**) donde el CH<sub>2</sub> más próximo al nitrógeno tiene  $\delta$  = 42.3 – 42.0 ppm, el CH<sub>2</sub> intermedio  $\delta$  = 23.5 – 23.4 ppm y el CH<sub>3</sub> terminal  $\delta$  = 11.7 – 11.5 ppm; por último, y, por último, el fenilo de **FAB-10** muestra cuatro señales: C-1'' a  $\delta$  = 138.2 ppm, C-2'' y C-6'' a  $\delta$  = 129.1 ppm, C-3'' y C-5'' a  $\delta$  = 119.8 ppm y C-4'' a  $\delta$  = 123.8 ppm.

#### 4.2.4. Estudios biológicos

Los ensayos biológicos llevados a cabo en la familia de las tiadiazolinas dieron lugar a unos resultados interesantes.

La tabla 13 recoge el cribado preliminar con las isoformas inducible y neuronal de la NOS. En este caso, los compuestos se ensayaron a una concentración de 1 mM, obteniéndose valores comprendidos entre 28.09% y 58.07% para iNOS, mientras que en nNOS los porcentajes oscilan entre 26.8% y 74.11%.

**Tabla 13.** Porcentajes de inhibición a concentración 1 mM de la familia **B**.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	% inhibición iNOS	% inhibición nNOS
<b>FAB-8</b>	H	Et	28.09 ± 0.61	74.11 ± 1.87
<b>FAB-9</b>	H	Pr	58.07 ± 1.39	64.60 ± 1.50
<b>FAB-10</b>	H	Ph	42.06 ± 0.62	67.02 ± 0.17
<b>FAB-11</b>	5-OMe	Et	53.54 ± 0.23	33.30 ± 1.05
<b>FAB-12</b>	5-OMe	Pr	57.61 ± 1.33	26.80 ± 2.68

Una simple comparación de porcentajes nos permite afirmar que esta familia es más potente frente a la isoforma neuronal que la **A**. En este caso, la importancia para la actividad del sustituyente en R<sub>2</sub> decrece en favor de R<sub>1</sub>, donde los compuestos con el anillo aromático sin sustituir presentan los mayores porcentajes de inhibición.

En esta familia se seleccionaron tres candidatos para el cálculo de sus IC<sub>50</sub>, los resultados obtenidos aparecen en la tabla 14. Entre ellos **FAB-8** resultó ser el inhibidor nNOS más potente.

**Tabla 14.** Valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la actividad nNOS de las tiadiazolinas más potentes.

nNOS	
Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>FAB-8</b>	420
<b>FAB-9</b>	720
<b>FAB-10</b>	770

### 4.3. Familia C

#### 4.3.1. Diseño molecular

Esta familia supone una aproximación más clásica a las kinurenaminas, derivados análogos del principal metabolito a nivel cerebral de la melatonina. No obstante, el principal factor diferencial de esta nueva serie de compuestos es el cambio isostérico del oxígeno amídico por un nitrógeno, dando lugar a la función imidamida. Esta familia, por tanto, se podría denominar como derivados de 3-oxo ó 3-hidroxiopropil-imidamidas.

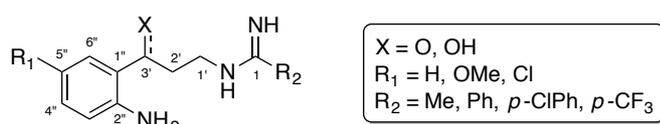
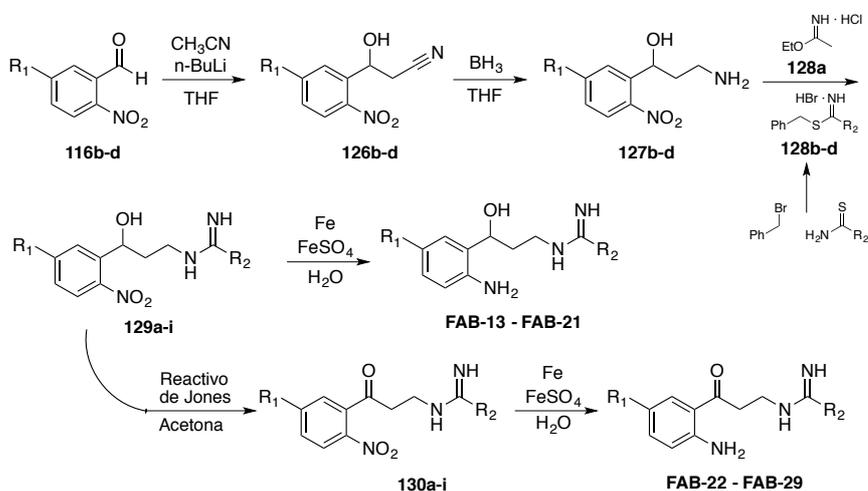


Figura 41. Estructura general de la familia C.

#### 4.3.2. Síntesis química



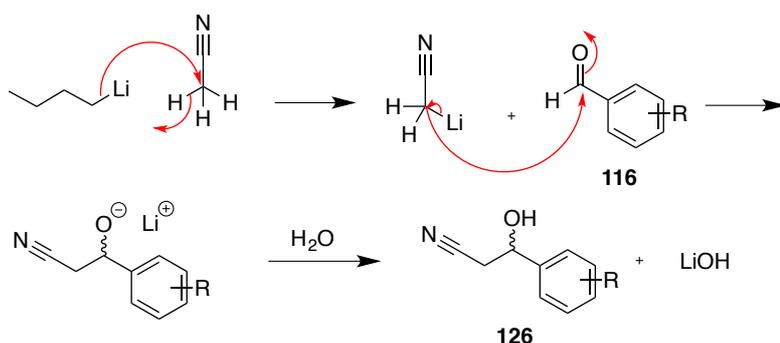
	C-3'	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
FAB-13	OH	Cl	Me
FAB-14	OH	OMe	Me
FAB-15	OH	OMe	Ph
FAB-16	OH	OMe	<i>p</i> -ClPh
FAB-17	OH	OMe	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> Ph
FAB-18	OH	H	Me
FAB-19	OH	H	Ph
FAB-20	OH	H	<i>p</i> -ClPh
FAB-21	OH	H	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> Ph

	C-3'	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
FAB-22	O	Cl	Me
FAB-23	O	OMe	Me
FAB-24	O	OMe	Ph
FAB-25	O	OMe	<i>p</i> -ClPh
FAB-26	O	H	Me
FAB-27	O	H	Ph
FAB-28	O	H	<i>p</i> -ClPh
FAB-29	O	H	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> Ph

Esquema 5. Ruta sintética para la familia C.

Al igual que en la familia **A**, los productos de partida de esta ruta sintética son los nitrobenzaldehídos **116b-d**, con la diferencia de que en lugar del derivado trimetoxilado **116a**, utilizaremos el 2-nitrobenzaldehído **116d**, de origen comercial.

La primera reacción consiste en una adición nucleofílica al grupo carbonilo de **116b-d**. El nucleófilo necesario para esta reacción se genera mediante metalación del acetonitrilo en presencia de *n*-BuLi, dando lugar a (cianometil)lito. Este ataca al grupo carbonilo y origina una cadena lateral de propanonitrilo con un grupo hidroxilo en posición 3 (**126b-d**).



**Esquema 6.** Mecanismo de formación de los derivados de 3-hidroxi-3-fenilpropanonitrilo.

A continuación, se reduce el triple enlace con una solución de borano en THF y posterior tratamiento con HCl concentrado, apareciendo las aminas primarias **127b-d**.

Para el siguiente paso es necesario sintetizar los bencimidotioatos de bencilo **128b-d**, partiendo de bromuro de bencilo y la correspondiente benzotioamida.<sup>169</sup>

La reacción entre las aminas **127b-d** y **128a-d**, donde incluimos el acetimidato de etilo **128a** disponible comercialmente, genera 9 intermedios **129a-i**, en los que aparece por primera vez la función principal de esta familia: la imidamida.

En este punto la ruta sintética se bifurca. Por un lado, para obtener los productos finales **FAB-14** – **FAB-22**, hemos de reducir el grupo nitro a amino mediante la reacción con hierro y sulfato ferroso en agua. Por otro lado, el resto de productos finales, requieren de una oxidación con el reactivo de Jones para dar lugar a las cetonas **130a-i** que, posteriormente,

sufrirán la misma reducción antes mencionada y cuyo resultado será la formación de los compuestos finales **FAB-23 – FAB-29**.

#### 4.3.3. Análisis espectroscópico

Todos los compuestos que no han sido descritos previamente se han identificado por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN (400 o 500 MHz) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (101 o 125), ayudándonos de estudios de RMN bidimensional HSQC y HMBC para la determinación inequívoca de los desplazamientos químicos de los átomos de H y C presentes en estas moléculas.

Las tablas que aparecen a continuación incluyen, en primer lugar los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en ppm, a continuación, entre paréntesis, está reflejada la multiplicidad de dicha señal y sus correspondientes constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz.

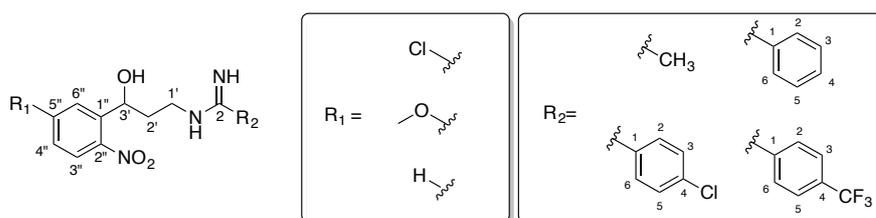
El disolvente utilizado principalmente para disolver las muestras fue metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{COD}$ ), en los casos en los que la solubilidad no lo permitió o se buscaba observar los protones lábiles unidos a nitrógeno u oxígeno se utilizó dimetilsulfóxido deuterado ( $d_6$ -DMSO).

La numeración de la estructura común a todos estos compuestos sigue las reglas establecidas por la IUPAC, comenzando por el núcleo de imidamida, continuando con la cadena propílica unida al nitrógeno 1, seguida del anillo aromático unido a 3' y, por último, los diferentes sustituyentes de  $\text{R}_2$ .

Comenzaremos con el estudio de  $^1\text{H}$ -RMN en los intermedios con grupo hidroxilo en 3', **129a – 129i**, recogido en la tabla 15.

La cadena propílica consta de cinco protones. Los dos primeros, en posición 1', aparecen como un único multiplete a  $\delta = 3.85 - 3.52$  ppm; los dos protones en posición 2', debido a la influencia del centro estereogénico en 3', aparecen como dos multipletes separados:  $\delta = 2.35 - 2.10$  ppm y  $\delta = 2.08 - 1.84$  ppm; por último, H-3' puede aparecer como doblete, doble doblete o multiplete entre  $\delta = 5.59 - 5.13$  ppm, con constantes de acoplamiento cuando corresponden de  $J = 10.4 - 9.3$  Hz y  $J = 2.4 - 2.0$  Hz.

**Tabla 15.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H}$ -RMN para los productos intermedios **129a** – **129i**.



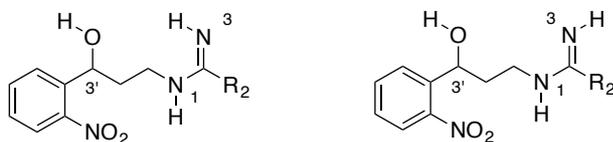
	<b>129a</b>	<b>129b</b>	<b>129c</b>	<b>129d</b>	<b>129e</b>	<b>129f</b>	<b>129g</b>	<b>129h</b>	<b>129i</b>
H-1'	3.52 (m)	3.55 (m)	3.85 (m)	3.80 (m)	3.83 (m)	3.52 (m)	3.61 (m)	3.81 (m)	3.62 (m)
H-2'a	2.34 (m)	2.13 (m)	2.35 (m)	2.32 (m)	2.32 (m)	2.13 (m)	2.10 (m)	2.32 (m)	2.10 (m)
H-2'b	1.85 (m)	1.84 (m)	2.02 (m)	1.99 (m)	1.98 (m)	1.91 (m)	1.93 (m)	2.08 (m)	1.92 (m)
H-3'	5.27 (dd, 9.5, 2.3)	5.42 (dd, 9.3, 2.0)	5.59 (dd, 9.4, 2.1)	5.55 (dd, 10.4, 2.1)	5.55 (dd, 9.4, 2.1)	5.24 (d, 9.4)	5.14 (m)	5.42 (dd, 9.6, 2.4)	5.13 (dd, 9.2, 2.1)
H-3''	8.00 (d, 8.7)	8.08 (d, 9.1)	8.14 (d, 9.1)	8.14 (d, 9.1)	8.14 (d, 9.1)	7.90 (dd, 7.5, 4.7)	7.87 (dd, 7.9, 1.3)	8.02 (ddd, 8.2, 2.9, 1.1)	7.86 (d, 7.5)
H-4''	7.51 (dd, 8.7, 2.3)	7.00 (dd, 9.1, 2.7)	7.05 (dd, 9.1, 2.8)	7.04 (dd, 9.1, 2.8)	7.04 (dd, 9.1, 2.8)	7.71 (t, 7.5)	7.74 (m)	7.82 (dt, 7.4, 1.2)	7.76 (t, 7.5)
H-5''	-	-	-	-	-	7.48 (t, 7.5)	7.53 (dt, 8.3, 1.3)	7.58 (dt, 7.5, 1.5)	7.52 (t, 7.5)
H-6''	7.91 (d, 2.3)	7.44 (d, 2.7)	7.53 (d, 2.8)	7.51 (d, 2.8)	7.51 (d, 2.8)	7.90 (dd, 7.5, 4.7)	7.91 (dd, 8.2, 1.1)	8.02 (ddd, 8.2, 2.9, 1.1)	7.91 (d, 8.4)
-OCH <sub>3</sub>	-	3.93 (s)	3.98 (s)	3.97 (s)	3.97 (s)	-	-	-	-
-CH <sub>3</sub>	2.26 (s)	2.28 (s)	-	-	-	2.26 (s)	-	-	-
R-2 R-6	-	-	7.88 (d, 7.3)	7.85 (d, 8.7)	8.02 (d, 8.3)	-	7.74 (m)	7.87 (d, 8.7)	7.98 (dd, 26.1, 8.3)
R-3 R-5	-	-	7.68 (t, 7.8)	7.68 (d, 8.7)	7.97 (d, 8.3)	-	7.68 (t, 7.6)	7.71 (d, 8.7)	
R-4	-	-	7.78 (t, 7.5)	-	-	-	7.74 (m)	-	-

Las señales del anillo aromático que contiene el grupo nitro, en función del sustituyente que tenga en posición 5'', puede dar lugar a dos variantes:

En **129a** – **129e** la ausencia del protón en 5'' provoca que la señal de H-3'' sea un doblete de  $\delta = 8.14 - 8.00$  ppm que se acopla con H-4'' con  $J = 9.1 - 8.7$  Hz; H-4'' es un doblete a  $\delta = 7.51 - 7.00$  ppm por su acoplamiento con H-3'' ( $J = 9.1 - 8.7$  Hz) y con H-6'' ( $J = 2.8 - 2.3$  Hz), y finalmente, H-6'' aparece como un doblete a  $\delta = 7.91 - 7.44$  ppm que se acopla con H-4'' ( $J = 2.8 - 2.3$  Hz).

En **129f** – **129i**, el anillo tiene cuatro protones contiguos, lo que aumenta la complejidad de las señales. A campo más alto ( $\delta = 8.02 - 7.86$  ppm), aparecen H-6'' y H-3'', con la posibilidad de que colapsen en una única señal, las multiplicidades que presenta son: doblete en **129i** ( $J = 8.4 - 7.5$  Hz), doblete en **129f** y **129g** ( $J = 8.2 - 7.5$  Hz y  $J = 4.7 - 1.1$  Hz) y doblete en **129h** ( $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.9$  Hz y  $J = 1.1$  Hz). La señal de H-4'' aparece entre  $\delta = 7.82 - 7.71$  ppm, con multiplicidad de triplete en **129f** y **129i** ( $J = 7.5$  Hz), doblete en **129h** ( $J = 7.4$  Hz y  $J = 1.2$  Hz), y multiplete en **129g**. Por último, la señal de H-5'' tiene un  $\delta = 7.58 - 7.48$  ppm y puede aparecer como triplete en **129f** y **129i** ( $J = 7.5$  Hz) o como doblete en **129g** y **129h** ( $J = 8.3 - 7.5$  Hz y  $J = 1.5 - 1.3$  Hz).

Los espectros que se realizaron en DMSO-  $d_6$  (**129g** y **129i**) muestran los protones unidos a los átomos de nitrógeno y oxígeno. El grupo hidroxilo en posición 3' aparece a  $\delta = 5.82 - 5.78$  ppm como singlete ancho o como doblete con  $J = 4.5$  Hz. Los dos protones unidos a los nitrógenos 1 y 3 del núcleo de imidamida presentan tres singletes anchos: H-1 es un singlete ancho a  $\delta = 9.98 - 9.77$  ppm, mientras que H-3 se desdobra en dos señales ( $\delta = 9.60 - 9.48$  ppm y  $\delta = 9.35 - 9.05$  ppm) en función de la disposición relativa al doble enlace.



**Figura 42.** Disposición de los protones lábiles que aparecen en los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  realizados en DMSO-  $d_6$ .

Sólo quedan por describir las señales de los sustituyentes en  $\text{R}_2$ :

Los derivados con metilo (**129a**, **129b** y **129f**) presentan un singlete a  $\delta = 2.28 - 2.26$  ppm.

En los derivados con fenilo (**129c** y **129g**), los protones en posición 2 y 6 pueden aparecer como un doblete a  $\delta = 7.88$  ppm con  $J = 7.3$  Hz, o bien,

pueden colapsar en único multiplete con H-4 a  $\delta = 7.74$  ppm. En el caso de aparecer H-4 por separado, lo hace como triplete a  $\delta = 7.78$  ppm y  $J = 7.5$  Hz. Los protones en posición 3 y 5 resuenan a  $\delta = 7.68$  ppm en forma de triplete con  $J = 7.8 - 7.6$  Hz.

Cuando se trata de *p*-clorofenilo, como en **129d** y **129h**, en el espectro aparecen dos dobletes, el primero a  $\delta = 7.87 - 7.85$  ppm, correspondiente con H-2 y H-6; y el segundo a  $\delta = 7.71 - 7.68$  ppm, correspondiente con H-3 y H-5. En todos los casos la constante de acoplamiento es la misma ( $J = 8.7$  Hz).

Finalmente, los derivados con *p*-trifluorometilfenilo pueden presentar sus protones como dos dobletes en **129e** a  $\delta = 8.02$  ppm H-2 y H-6 y a  $\delta = 7.97$  ppm H-3 y H-5 en ambos casos con  $J = 8.3$  Hz; o como un doblete en **129i** a  $\delta = 7.98$  ppm con  $J = 26.1$  y  $8.3$  Hz.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN todos los compuestos presentan una zona alifática muy similar.

El carbono de la función principal de imidamida (C-2) aparece como el más desapantallado entre  $\delta = 166.20 - 162.20$  ppm.

Las señales de la cadena propílica se distribuyen entre  $\delta = 41.60 - 36.02$  ppm para C-1',  $\delta = 37.29 - 30.70$  ppm para C-2' y  $\delta = 67.80 - 65.40$  ppm para C-3'.

En el anillo aromático unido a 3', los dos primeros carbonos cuaternarios se mantienen estables en todos los espectros: C-1'' aparece entre  $\delta = 148.81 - 145.66$  ppm y C-2'' entre  $\delta = 144.35 - 140.19$  ppm. El resto de carbonos aromáticos se ve influenciado por el sustituyente de 5'':

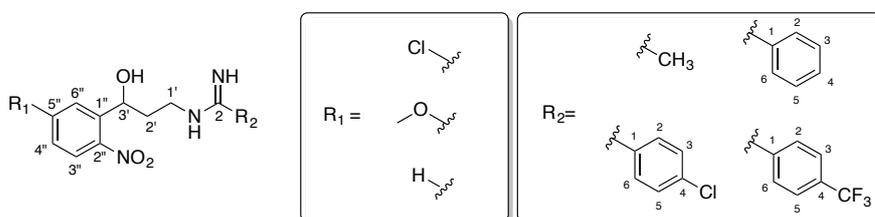
En **129a** el átomo de cloro complica la diferenciación entre C-3'', C-4'' y C-6'' apareciendo en el rango  $\delta = 129.51 - 127.46$  ppm, C-5'' se encuentra en  $\delta = 141.08$  ppm.

Los derivados metoxilados **129b - 129e**, muestran C-3'' a  $\delta = 130.57 - 128.65$  ppm, C-4'' a  $\delta = 114.21 - 114.16$  ppm, C-6'' a  $\delta = 113.74 - 113.65$  ppm y el carbono cuaternario C-5'' a  $\delta = 165.51 - 165.02$  ppm. El carbono del metoxilo unido a este último tiene un  $\delta = 56.66 - 56.59$  ppm.

Los compuestos no sustituidos en 5'' **129f - 129i**, presentan C-3'' entre  $\delta = 125.30 - 123.89$  ppm, C-4'' entre  $\delta = 134.81 - 133.49$  ppm y los carbonos

C-5'' y C-6'' tienen desplazamientos muy similares comprendidos entre  $\delta = 129.50 - 128.22$  ppm.

**Tabla 16.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos intermedios **129a** – **129i**.

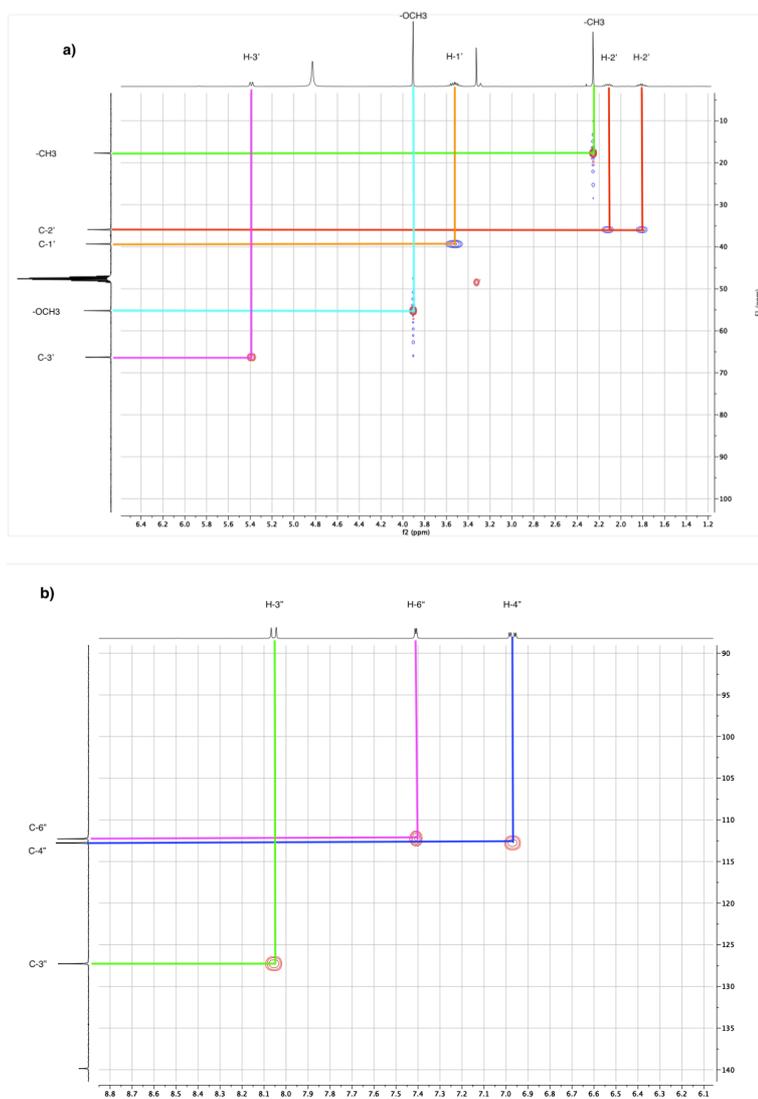
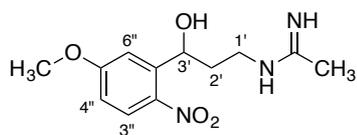


<sup>a</sup> Las señales marcadas pueden considerarse intercambiables.

	<b>129a</b>	<b>129b</b>	<b>129c</b>	<b>129d</b>	<b>129e</b>	<b>129f</b>	<b>129g</b>	<b>129h</b>	<b>129i</b>
C-2	166.20	166.14	165.84	165.58	165.66	166.08	163.17	165.01	162.20
C-1'	40.55	40.71	41.43	41.50	41.60	40.75	36.02	41.50	40.02
C-2'	37.15	37.29	37.24	37.22	37.20	37.29	30.70	37.29	35.94
C-3'	67.24	67.68	67.80	67.79	67.80	67.34	65.40	67.50	65.45
C-1''	146.99	145.66	145.67	145.74	145.80	148.74	147.36	148.81	147.36
C-2''	144.35	141.24	141.13	141.21	141.29	141.51	140.19	140.74	140.19
C-3''	129.51 <sup>a</sup>	128.65	130.57	128.73	128.78	125.22	123.89	125.30	123.92
C-4''	129.18 <sup>a</sup>	114.16	114.21	114.21	114.20	134.70	133.49	134.81	133.52
C-5''	141.08	165.50	165.51	165.02	165.07	129.40 <sup>a</sup>	128.34 <sup>a</sup>	129.50 <sup>a</sup>	128.37
C-6''	127.46 <sup>a</sup>	113.65	113.70	113.71	113.74	129.11 <sup>a</sup>	128.22 <sup>a</sup>	129.19 <sup>a</sup>	128.22
-OCH <sub>3</sub>	-	56.59	56.66	56.62	56.59	-	-	-	-
-CH <sub>3</sub>	19.04	19.07	-	-	-	19.08	-	-	-
R-1	-	-	134.61	129.27	134.56	-	129.14	129.23	133.14
R-2 R-6	-	-	130.36	130.78	130.09	-	128.88	130.83 130.80	129.40
R-3 R-5	-	-	128.96	130.57	127.28	-	128.15	130.58	125.77
R-4	-	-	128.70	140.76	135.75	-	133.22	141.67	132.72
-CF <sub>3</sub>	-	-	-	-	124.92	-	-	-	123.56

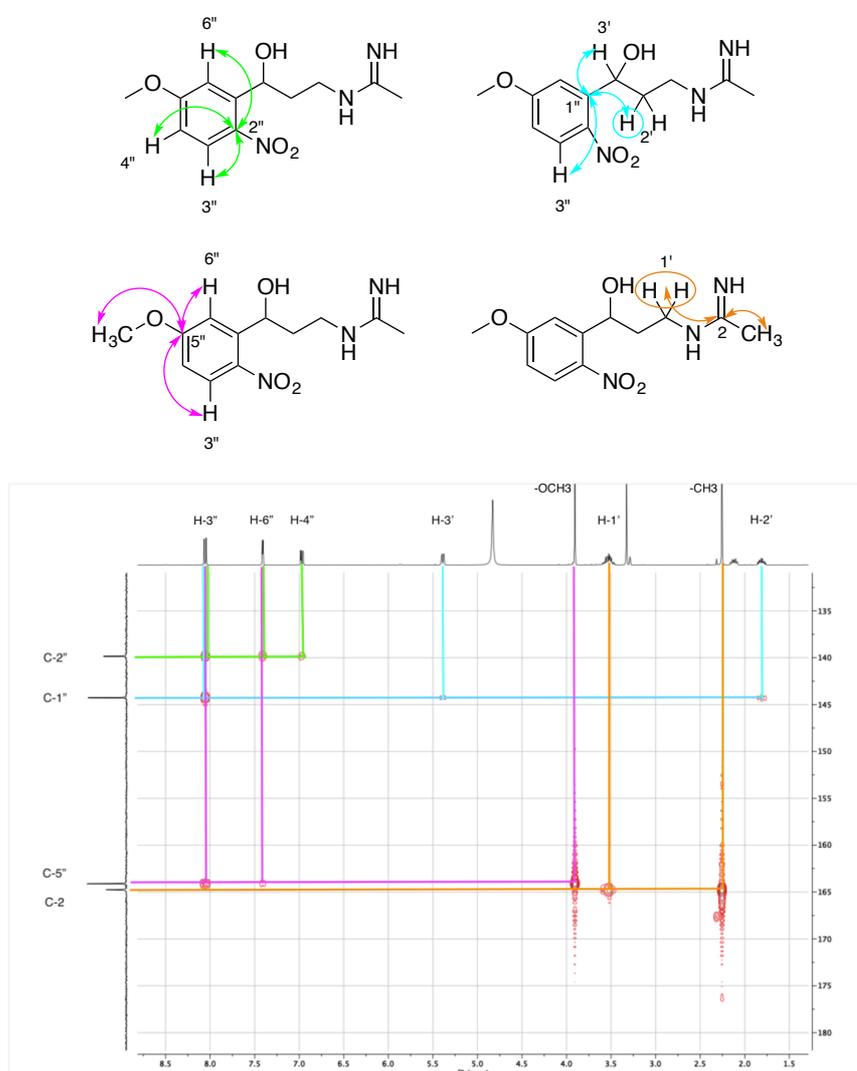
Debido a que las señales de los carbonos de R<sub>2</sub> apenas varía a lo largo de los compuestos de esta familia, se ha decidido describirlas todas al final de este apartado.

Para aclarar la distribución de alguna de las señales de esta familia, los experimentos bidimensionales de correlación  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  realizados sobre **129b** fueron de gran ayuda.



**Figura 43.** Correlaciones HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de la región alifática (a) y aromática (b) de **129b**.

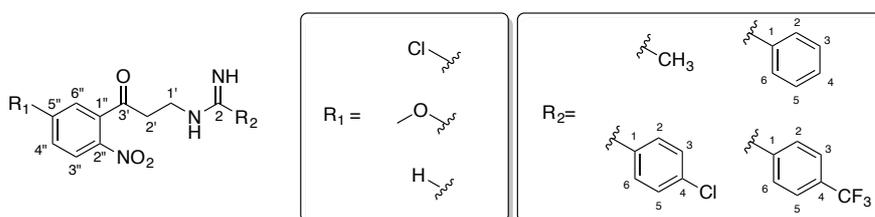
La ampliación de la región alifática en HSQC (Figura 43a) corrobora el desdoblamiento de la señal de H-2' y permite emparejar las señales de cada protón con el carbono al que se encuentra unido. En la región aromática (Figura 43b) pueden diferenciarse los carbonos C-4'' y C-6'' separados por apenas 0.5 ppm.



**Figura 44.** Correlaciones HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de la región cuaternaria de **129b**, destacando C-2''(verde), C-1'' (azul), C-5'' (rosa) y C-2 (naranja).

Para la asignación de los carbonos cuaternarios hubo que recurrir al HMBC (Figura 45) y así poder observar los acoplamiento a larga distancia.

**Tabla 17.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H}$ -RMN para los productos intermedios **130a** – **130i**.



	<b>130a</b>	<b>130b</b>	<b>130c</b>	<b>130d</b>	<b>130f</b>	<b>130g</b>	<b>130h</b>	<b>130i</b>
H-1'	3.76 (t, 5.8)	3.75 (t, 6.0)	3.36 (m)	3.97 (t, 5.6)	3.74 (t, 5.9)	3.98 (m)	3.96 (t, 5.8)	3.98 (m)
H-2'	3.31 (t, 5.8)	3.24 (t, 6.0)		3.35 (m)	3.30 (m)	3.37 (m)	3.44 (t, 5.8)	3.35 (m)
H-3''	8.23 (d, 8.6)	8.22 (d, 9.2)	8.23 (d, 9.1)	8.26 (d, 9.2)	8.16 (d, 8.2)	8.22 (dd, 8.2, 0.8)	8.20 (dd, 8.2, 0.9)	8.21 (d, 8.2)
H-4''	7.79 (dd, 8.6, 2.2)	7.20 (dd, 9.2, 2.7)	7.21 (dd, 9.1, 2.0)	7.24 (dd, 9.2, 2.7)	7.76 (dd, 8.2, 7.8)	7.82 (m)	7.29 (m)	7.79 (t, 7.8)
H-5''	-	-	-	-	7.87 (dd, 7.8, 7.3)	7.91 (dt, 7.6, 3.8)	7.90 (dt, 7.6, 0.9)	7.90 (t, 7.5)
H-6''	7.77 (d, 2.2)	7.11 (d, 2.7)	7.13 (d, 2.0)	7.16 (d, 2.7)	7.70 (d, 7.3)	7.76 (m)	7.42 (dd, 7.6, 1.5)	7.71 (d, 7.5)
-OCH <sub>3</sub>	-	3.98 (s)	3.98 (s)	4.01 (s)	-	-	-	-
-CH <sub>3</sub>	2.31 (s)	2.29 (s)	-	-	2.28 (s)	-	-	-
R-2 R-6	-	-	7.83 (d, 7.6)	7.82 (d, 8.5)	-	7.82 (m)	7.82 (d, 8.6)	7.98 (q, 8.7)
R-3 R-5	-	-	7.64 (t, 7.5)	7.67 (d, 8.5)	-	7.67 (m)	7.67 (d, 8.6)	
R-4	-	-	7.76 (t, 7.3)	-	-	7.76 (m)	-	

Continuamos con el estudio de  $^1\text{H}$ -RMN de los nitroderivados con un grupo carbonilo en 3' **130a** – **130i**:

La cadena propílica presenta dos señales diferentes, la más apantallada es H-2' pudiendo aparecer como multiplete o como triplete entre  $\delta = 3.44$  –  $3.24$  ppm y con  $J = 6.0$  –  $5.8$  Hz, cuando corresponde; H-1' aparece a  $\delta = 3.98$  –  $3.74$  ppm y del mismo modo puede ser un multiplete o un triplete con  $J = 6.0$  –  $5.8$  Hz. En el caso de **130c** las dos señales colapsan en único multiplete a  $\delta = 3.36$  ppm.

El anillo aromático unido a la cadena propílica presenta diferentes desplazamientos químicos y multiplicidades en función del sustituyente en 5":

En **130a** el cloro de 5" hace que H-3" aparezca como un doblete de  $\delta = 8.23$  ppm que se acopla con H-4" con  $J = 8.6$  Hz; H-4" es un doblete a  $\delta = 7.79$  ppm por su acoplamiento con H-3" ( $J = 8.6$  Hz) y con H-6" ( $J = 2.2$  Hz), y finalmente, H-6" un doblete a  $\delta = 7.77$  ppm que se acopla con H-4" ( $J = 2.2$  Hz).

Los derivados con un metoxilo en posición 5" (**130b – 130d**), presentan la misma multiplicidad que en el compuesto anterior pero con desplazamientos químicos diferentes: H-3" es un doblete de  $\delta = 8.26 – 8.22$  ppm que se acopla con H-4" con  $J = 9.2 – 9.1$  Hz, H-4" es un doblete a  $\delta = 7.24 – 7.20$  ppm por su acoplamiento con H-3" ( $J = 9.2 – 9.1$  Hz) y con H-6" ( $J = 2.7 – 2.0$  Hz), y finalmente, H-6" un doblete a  $\delta = 7.16 – 7.11$  ppm que se acopla con H-4" ( $J = 2.7 – 2.0$  Hz). Los tres protones del grupo metoxilo unido a este anillo aparecen como un singlete a  $\delta = 4.01 – 3.98$  ppm.

En **130f – 130i**, el anillo tiene cuatro protones contiguos, lo que aumenta la complejidad de las señales. A campo más alto ( $\delta = 8.22 – 8.16$  ppm), aparece H-3", con multiplicidad de doblete en **130f** y **130i** ( $J = 8.2$  Hz) y doblete en **130g** y **130h** ( $J = 8.2$  Hz y  $J = 0.9 – 0.8$  Hz). La señal de H-4" aparece entre  $\delta = 7.82 – 7.29$  ppm, con multiplicidad de triplete en **130i** ( $J = 7.8$  Hz), doblete en **130f** ( $J = 8.2$  Hz y  $J = 7.8$  Hz), y multiplete en **130g** y **130h**. La señal de H-5" tiene un  $\delta = 7.91 – 7.87$  ppm y puede aparecer como doblete en **130f** ( $J = 7.8$  y  $7.3$  Hz), triplete en **130i** ( $J = 7.5$  Hz) o como doblete en **130g** y **130h** ( $J = 7.6$  Hz y  $J = 3.8 – 0.9$  Hz). Por último, H-6" se encuentra entre  $\delta = 7.76 – 7.42$  ppm y aparece como doblete en **130f** y **130i** ( $J = 7.5 – 7.3$  Hz), como doblete en **130h** ( $J = 7.6$  y  $1.5$  Hz) y como multiplete en **130g**.

Sólo quedan por describir las señales de los sustituyentes en R<sub>2</sub>:

Los derivados con metilo (**130a**, **130b** y **130f**) presentan un singlete a  $\delta = 2.31 – 2.28$  ppm.

En los derivados con fenilo (**130c** y **130g**), los protones en posición 2 y 6 pueden aparecer como un doblete a  $\delta = 7.83$  ppm con  $J = 7.6$  Hz, o bien en un multiplete a  $\delta = 7.82$  ppm. Los protones en posición 3 y 5 resuenan a  $\delta = 7.64$  ppm en forma de triplete con  $J = 7.5$  Hz o son un multiplete de  $\delta =$

7.67 ppm. En el caso de H-4 puede ser un triplete a  $\delta = 7.76$  ppm y  $J = 7.3$  Hz o un multiplete centrado en  $\delta = 7.76$  ppm

Cuando se trata de *p*-clorofenilo, como en **130d** y **130h**, en el espectro aparecen dos dobletes, el primero a  $\delta = 7.87$  ppm, correspondiente con H-2 y H-6; y el segundo a  $\delta = 7.67$  ppm, correspondiente con H-3 y H-5. En todos los casos la constante de acoplamiento es la misma  $J = 8.5$  Hz y  $J = 8.6$  Hz, respectivamente.

Finalmente, el derivado **130i** con *p*-trifluorometilfenilo presenta sus protones como un cuadruplete a  $\delta = 7.98$  ppm, con  $J = 8.7$  Hz.

En los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN, como se puede comprobar en la tabla 18, todos los compuestos presentan una zona alifática muy similar.

El carbono de la función principal de imidamida (C-2), a pesar de conservar la señal entre  $\delta = 168.49 - 164.88$  ppm, deja de ser el carbono más desapantallado en favor de C-3' debido al efecto del grupo carbonilo presente en dicha posición.

Las señales de la cadena propílica se distribuyen entre  $\delta = 47.94 - 38.58$  ppm para C-1',  $\delta = 38.73 - 35.80$  ppm para C-2' y  $\delta = 201.35 - 198.31$  ppm para C-3'.

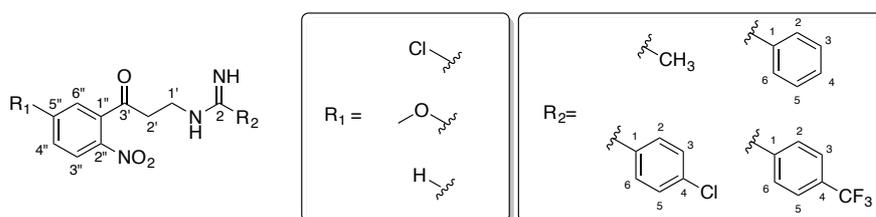
En el anillo aromático unido a 3', los tres primeros carbonos se mantienen estables en todos los espectros: C-1'' aparece entre  $\delta = 140.79 - 137.68$  ppm, C-2'' entre  $\delta = 147.24 - 140.82$  ppm y C-3'' entre  $\delta = 128.36 - 125.52$  ppm. El resto de carbonos aromáticos se ve influenciado por el sustituyente de 5'':

En **130a** el átomo de cloro desplaza la señal de C-4'' hasta  $\delta = 130.85$  ppm, el carbono cuaternario C-5'' se encuentra en  $\delta = 140.62$  ppm y C-6'' aparece a  $\delta = 127.40$  ppm.

Los derivados metoxilados **130b - 130d**, muestran C-4'' a  $\delta = 116.71 - 116.51$  ppm, C-6'' a  $\delta = 113.64 - 113.52$  ppm y el carbono cuaternario C-5'' a  $\delta = 166.16 - 165.15$  ppm. El carbono del metoxilo unido a este último tiene un  $\delta = 57.30 - 57.21$  ppm.

Los compuestos sin sustituyentes en 5'' **130f - 130i**, presentan C-4'' entre  $\delta = 132.54 - 132.48$  ppm, C-5'' entre  $\delta = 135.74 - 135.62$  ppm y C-6'' entre  $\delta = 128.91 - 128.84$  ppm.

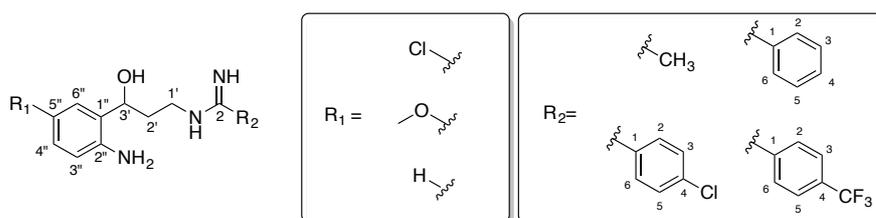
**Tabla 18.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos intermedios **130a** – **130i**.



	<b>130a</b>	<b>130b</b>	<b>130c</b>	<b>130d</b>	<b>130f</b>	<b>130g</b>	<b>130h</b>	<b>130i</b>
C-2	164.88	166.27	168.49	166.19	166.23	166.11	165.02	165.08
C-1'	39.84	41.44	45.93	47.94	41.14	38.58	41.17	43.92
C-2'	36.36	37.92	35.80	38.60	37.94	37.57	38.72	38.73
C-3'	198.31	201.20	201.35	201.28	201.04	201.25	201.17	201.20
C-1''	138.12	139.28	139.18	140.79	137.68	137.76	137.69	137.74
C-2''	143.97	141.22	140.82	141.19	147.16	147.24	147.17	147.19
C-3''	126.04	128.32	128.29	128.36	125.52	125.60	125.56	125.61
C-4''	130.85	116.51	116.71	116.51	132.48	132.53	132.50	132.54
C-5''	140.62	166.16	166.16	165.15	135.62	135.69	135.68	135.74
C-6''	127.40	113.57	113.52	113.64	128.84	128.91	128.91	128.89
-OCH <sub>3</sub>	-	57.21	57.30	57.21	-	-	-	-
-CH <sub>3</sub>	17.65	19.06	-	-	19.05	-	-	-
R-1	-	-	128.85	129.32	-	130.70	129.19	134.47
R-2 R-6	-	-	128.90	130.83	-	130.35	130.82	130.13
R-3 R-5	-	-	128.62	130.75	-	129.02	130.53	127.22
R-4	-	-	135.22	139.30	-	134.63	140.75	135.71
-CF <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	124.90

Debido a que las señales de los carbonos de R<sub>2</sub> apenas varía a lo largo de los compuestos de esta familia, se ha decidido describirlas todas al final de este apartado.

**Tabla 19.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H}$ -RMN para los productos finales **FAB-13** – **FAB-21**.



	<b>FAB 13</b>	<b>FAB 14</b>	<b>FAB 15</b>	<b>FAB 16</b>	<b>FAB 17</b>	<b>FAB 18</b>	<b>FAB 19</b>	<b>FAB 20</b>	<b>FAB 21</b>
H-1'	3.32 (m)	3.37 (m)	3.65 (t, 7.0)	3.65 (t, 6.9)	3.67 (t, 6.9)	3.39 (m)	3.65 (m)	3.61 (t, 7.0)	3.64 (t, 6.9)
H-2'	1.99 (m)	2.08 (m)	2.26 (m)	2.27 (m)	2.28 (m)	2.14 (m)	2.26 (m)	2.27 (m)	2.28 (m)
H-3'	4.73 (t, 7.0)	4.96 (d, 3.4)	4.95 (dd, 8.0, 5.3)	4.95 (dd, 7.8, 5.4)	4.95 (dd, 8.0, 5.3)	4.60 (m)	4.91 (dd, 8.4, 5.0)	4.91 (m)	4.93 (dd, 8.4, 5.2)
H-3''	6.61 (d, 8.5)	6.79 (d, 8.7)	6.78 (d, 8.6)	6.77 (d, 8.6)	6.78 (d, 8.6)	6.74 (d, 7.9)	6.76 (dd, 8.0, 1.0)	6.77 (dd, 7.8, 1.1)	7.86 (d, 7.5)
H-4''	6.89 (dd, 8.5, 2.5)	6.70 (dd, 8.7, 2.8)	6.71 (dd, 8.6, 2.8)	6.71 (dd, 8.6, 2.8)	6.72 (dd, 8.6, 2.9)	7.03 (dt, 7.9, 1.1)	7.05 (dt, 8.0, 1.5)	7.06 (dt, 7.8, 1.4)	7.05 (dt, 7.9, 1.5)
H-5''	-	-	-	-	-	6.69 (dt, 7.9, 0.8)	6.71 (dt, 7.4, 1.0)	6.72 (dt, 7.8, 1.4)	6.71 (dt, 7.8, 1.4)
H-6''	7.06 (d, 2.5)	6.81 (d, 2.8)	6.88 (d, 2.8)	6.88 (d, 2.8)	6.89 (d, 2.9)	7.14 (dd, 7.9, 1.1)	7.18 (d, 7.4)	7.18 (dd, 7.4, 1.1)	7.19 (dd, 7.5, 1.5)
-OCH <sub>3</sub>	-	3.71 (s)	3.74 (s)	3.75 (s)	3.75 (s)	-	-	-	-
-CH <sub>3</sub>	2.14 (s)	2.19 (s)	-	-	-	2.22 (s)	-	-	-
R-2 R-6	-	-	7.74 (m)	7.74 (d, 8.6)	7.94 (m)	-	7.71 (d, 7.8)	7.70 (dt, 8.7, 2.1)	7.91 (m)
R-3 R-5	-	-	7.68 (t, 7.8)	7.65 (d, 8.6)		-	7.60 (t, 7.8)	7.64 (dt, 8.7, 2.4)	
R-4	-	-	7.74 (m)	-	-	-	7.74 (m)	-	-

A continuación, describiremos los  $^1\text{H}$ -RMN de los productos finales **FAB-13** – **FAB-21** (Tabla 19).

La cadena propílica presenta tres señales deferentes, H-1' aparece entre  $\delta = 3.67 - 3.32$  ppm como multiplete o como triplete con  $J = 7.0 - 6.9$  Hz; H-2' aparece como un multiplete a  $\delta = 2.28 - 1.99$  ppm y, por último, H-3' puede aparecer como doblete, doble doblete, triplete o multiplete entre  $\delta = 4.96 - 4.60$  ppm, con constantes de acoplamiento cuando corresponden de  $J = 8.4 - 7.0$  Hz y  $J = 5.4 - 5.0$  Hz.

El anillo aromático común a todas estas estructuras presenta diferentes desplazamientos químicos y multiplicidades en función del sustituyente en 5'':

En **FAB-13** la presencia de un átomo de cloro en 5'' provoca que la señal de H-3'' sea un doblete de  $\delta = 6.61$  ppm que se acopla con H-4'' con  $J = 8.5$  Hz, H-4'' es un doble doblete a  $\delta = 6.89$  ppm por su acoplamiento con H-3'' ( $J = 8.5$  Hz) y con H-6'' ( $J = 2.5$  Hz) y, finalmente, H-6'' un doblete a  $\delta = 7.06$  ppm que se acopla con H-4'' ( $J = 2.5$  Hz).

Los productos metoxilados en 5'' **FAB-14 - FAB-17** presentan la misma multiplicidad que el producto anterior, aunque a desplazamientos químicos diferentes: H-3'' es un doblete a  $\delta = 6.79 - 6.77$  ppm que se acopla con H-4'' con  $J = 8.7 - 8.6$  Hz, H-4'' es un doble doblete a  $\delta = 6.72 - 6.70$  ppm por su acoplamiento con H-3'' ( $J = 8.7 - 8.6$  Hz) y con H-6'' ( $J = 2.9 - 2.8$  Hz) y, finalmente, H-6'' un doblete a  $\delta = 6.89 - 6.81$  ppm que se acopla con H-4'' ( $J = 2.9 - 2.8$  Hz). Los tres protones del grupo metoxilo unido a este anillo aparecen como un singlete a  $\delta = 3.75 - 3.71$  ppm.

En **FAB-18 - FAB-21**, el anillo tiene cuatro protones contiguos, lo que aumenta la complejidad de las señales. A  $\delta = 6.86 - 6.74$  ppm aparece H-3'' en forma de doblete en **FAB-18** y **FAB-21** ( $J = 7.9 - 7.5$  Hz) y como doble doblete en **FAB-19** y **FAB-20** ( $J = 8.0 - 7.8$  Hz y  $J = 1.1 - 1.0$  Hz). La señal de H-4'' aparece como un doblete triplete entre  $\delta = 7.06 - 7.03$  ppm, con  $J = 8.0 - 7.8$  Hz y  $J = 1.5 - 1.1$  Hz. También aparece como doble triplete H-5'' entre  $\delta = 6.72 - 6.69$  ppm, con  $J = 7.9 - 7.4$  Hz y  $J = 1.4 - 0.8$  Hz). Por último, H-6'' se encuentra entre  $\delta = 7.19 - 7.14$  ppm en forma de doble doblete con constantes de acoplamiento  $J = 7.9 - 7.4$  Hz y  $J = 1.5 - 1.1$  Hz, salvo en **FAB-19** que aparece como doblete con  $J = 7.4$  Hz.

Sólo quedan por describir las señales de los sustituyentes en R<sub>2</sub>:

Los derivados con metilo (**FAB-13**, **FAB-14** y **FAB-18**) presentan un singlete a  $\delta = 2.28 - 2.19$  ppm.

En los derivados con fenilo (**FAB-15** y **FAB-19**), los protones en posición 2 y 6 pueden aparecer como un doblete a  $\delta = 7.71$  ppm con  $J = 7.8$  Hz, o bien, pueden colapsar en único multiplete con H-4 a  $\delta = 7.74$  ppm. Los protones en posición 3 y 5 resuenan a  $\delta = 7.68 - 7.60$  ppm en forma de triplete con  $J = 7.8$  Hz.

Cuando se trata de *p*-clorofenilo, como en **FAB-16** y **FAB-20**, en el espectro aparecen dos señales, a  $\delta = 7.74 - 7.70$  ppm la correspondiente a H-2 y H-6 en forma de doblete o doble triplete; y a  $\delta = 7.65 - 7.60$  ppm la de H-3 y H-5 en forma de doblete o doble triplete. En ambos casos la constante de acoplamiento es  $J = 8.7 - 8.6$  Hz y  $J = 2.4 - 2.1$  Hz cuando corresponda.

Finalmente, los derivados con *p*-trifluorometilfenilo **FAB-17** y **FAB-21** presentan sus protones como un único multiplete entre  $\delta = 7.94 - 7.91$  ppm.

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los productos finales **FAB-13** – **FAB-21** presenta las señales que aparecen en la tabla 20.

El carbono de la función principal de imidamida (C-2) aparece como el más desapantallado entre  $\delta = 166.07 - 164.70$  ppm.

Las señales de la cadena propílica se distribuyen entre  $\delta = 41.97 - 40.82$  ppm para C-1',  $\delta = 35.01 - 34.24$  ppm para C-2' y  $\delta = 71.53 - 67.80$  ppm para C-3'.

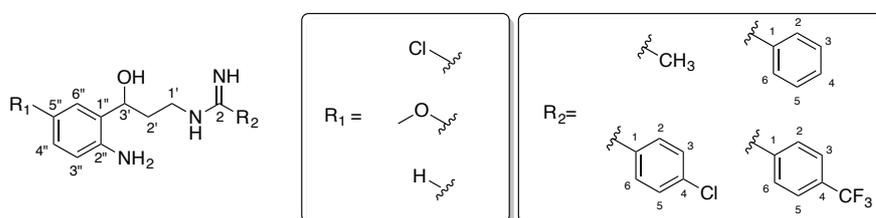
En el anillo aromático unido a 3', los tres primeros carbonos se mantienen estables en todos los espectros: C-1'' aparece entre  $\delta = 132.46 - 128.01$  ppm, C-2'' entre  $\delta = 146.34 - 136.55$  ppm y C-3'' entre  $\delta = 120.65 - 118.07$  ppm. El resto de carbonos aromáticos se ve influenciado por el sustituyente de 5'':

En **FAB-13** el átomo de cloro desplaza la señal de C-4'' hasta  $\delta = 128.75$  ppm, el carbono cuaternario C-5'' se encuentra en  $\delta = 123.30$  ppm y C-6'' aparece a  $\delta = 127.46$  ppm.

Los compuestos metoxilados **FAB-14** – **FAB-17**, muestran C-4'' a  $\delta = 114.81 - 114.80$  ppm, C-6'' a  $\delta = 113.89 - 113.73$  ppm y el carbono cuaternario C-5'' a  $\delta = 155.42 - 154.44$  ppm. El carbono del metoxilo unido a este último tiene un  $\delta = 56.14 - 56.13$  ppm.

Los productos finales sin sustituyentes en 5'' **FAB-18 – FAB-21**, presentan C-4'' entre  $\delta = 129.38 – 129.25$  ppm, C-5'' entre  $\delta = 119.36 – 119.27$  ppm y C-6'' entre  $\delta = 129.12 – 128.07$  ppm.

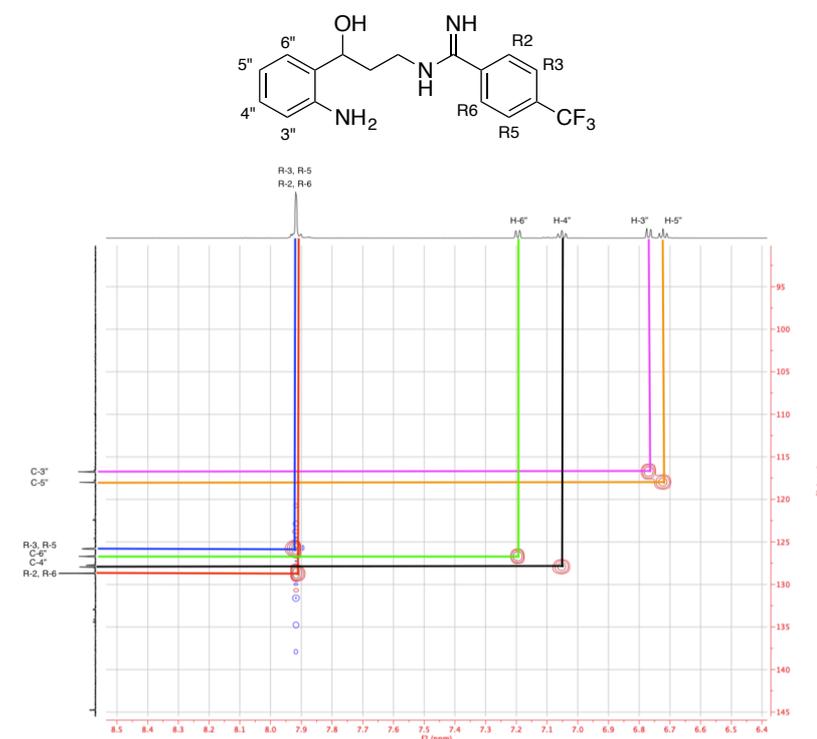
**Tabla 20.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos finales **FAB-13 – FAB-21**.



	<b>FAB 13</b>	<b>FAB 14</b>	<b>FAB 15</b>	<b>FAB 16</b>	<b>FAB 17</b>	<b>FAB 18</b>	<b>FAB 19</b>	<b>FAB 20</b>	<b>FAB 21</b>
C-2	166.04	166.07	165.71	164.75	164.73	166.02	165.79	164.89	164.70
C-1'	40.82	40.83	41.71	41.79	41.89	40.94	41.79	41.84	41.97
C-2'	34.38	35.01	34.71	34.64	34.61	34.49	34.36	34.24	34.29
C-3'	69.82	70.57	67.80	70.74	70.81	70.82	71.44	71.53	71.32
C-1''	130.81	132.46	131.41	131.27	131.40	128.01	128.07	129.03	129.13
C-2''	145.08	136.55	138.64	138.87	138.67	146.12	146.19	146.34	146.14
C-3''	118.90	120.65	119.78	119.67	119.79	118.07	118.14	118.11	118.13
C-4''	128.75	114.80	114.81	114.80	114.81	129.25	129.34	129.38	129.32
C-5''	123.30	155.42	154.55	154.44	154.58	119.27	119.36	119.30	119.36
C-6''	127.46	113.89	113.73	113.73	113.80	129.12	128.07	128.09	128.08
-OCH <sub>3</sub>	-	56.14	56.13	56.13	56.13	-	-	-	-
-CH <sub>3</sub>	19.03	18.95	-	-	-	18.99	-	-	-
R-1	-	-	130.56	129.14	134.37	-	129.14	129.24	134.33
R-2 R-6	-	-	130.36	130.74	130.08	-	130.38	130.69	130.07
R-3 R-5	-	-	128.90	130.53	127.21	-	128.90	130.56	127.19
R-4	-	-	134.61	140.74	135.70	-	134.62	140.82	135.66
-CF <sub>3</sub>	-	-	-	-	124.90	-	-	-	124.88

Debido a que las señales de los carbonos de R<sub>2</sub> apenas varía a lo largo de los compuestos de esta familia, se ha decidido describirlas todas al final de este apartado.

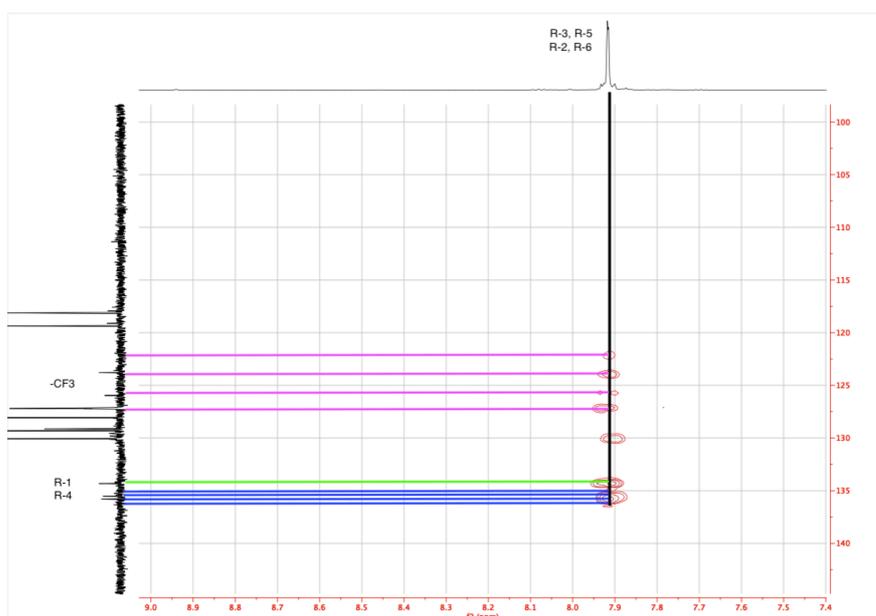
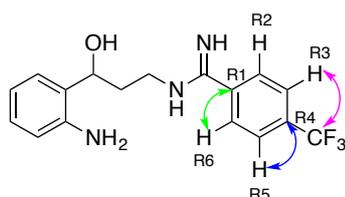
Con el fin asegurar la precisión de las señales asignadas, especialmente en el anillo sustituido en *para* por trifluorometilo, se realizó un estudio bidimensional de correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de **FAB-21**.



**Figura 46.** Zona aromática ampliada en la correlación HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de **FAB-21**.

En la correlación a corta distancia se aprecia el colapso de todas las señales  $^1\text{H}$ -RMN del anillo de *p*-trifluorometilfenilo y la distribución más clara del otro anillo aromático.

En el caso de la correlación a larga distancia (Figura 47), el colapso de las señales de  $^1\text{H}$ -RMN del anillo de *p*-trifluorometilfenilo, limitó la información que podía obtenerse. Fueron detectadas todas las señales debidas a los desdoblamientos en  $^{13}\text{C}$ -RMN del  $-\text{CF}_3$ , pero no pudieron diferenciarse por este método.



**Figura 47.** Zona aromática ampliada en la correlación HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de **FAB-21**, resaltando  $\text{CF}_3$  (rosa), R-1 (verde) y R-4 (azul).

Para completar la información espectroscópica de esta familia, se realizó un estudio intensivo del compuesto **FAB-13**, utilizando dimetilsulfóxido deuterado con el fin de fijar los protones lábiles unidos a O y N. Se llevaron a cabo experimentos bidimensionales de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  para asignar de forma inequívoca todas las señales de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ .

El HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (Figura 48) nos permitió localizar los nitrógenos N-1 a  $\delta = 123.25$  ppm y N-3 a  $\delta = 111.50$  ppm, desafortunadamente el nitrógeno del grupo amino no mostró correlación con sus protones.

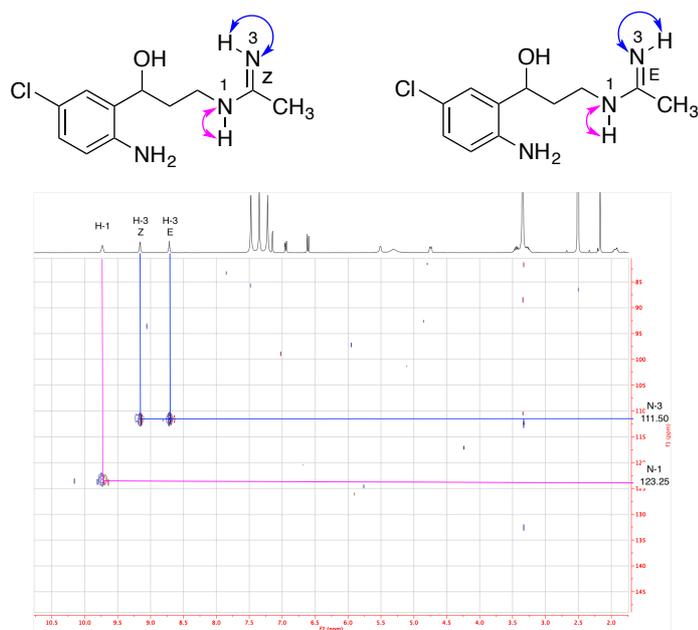


Figura 48. Correlaciones HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de FAB-13, resaltando N-1 (rosa) y N-3 (azul).

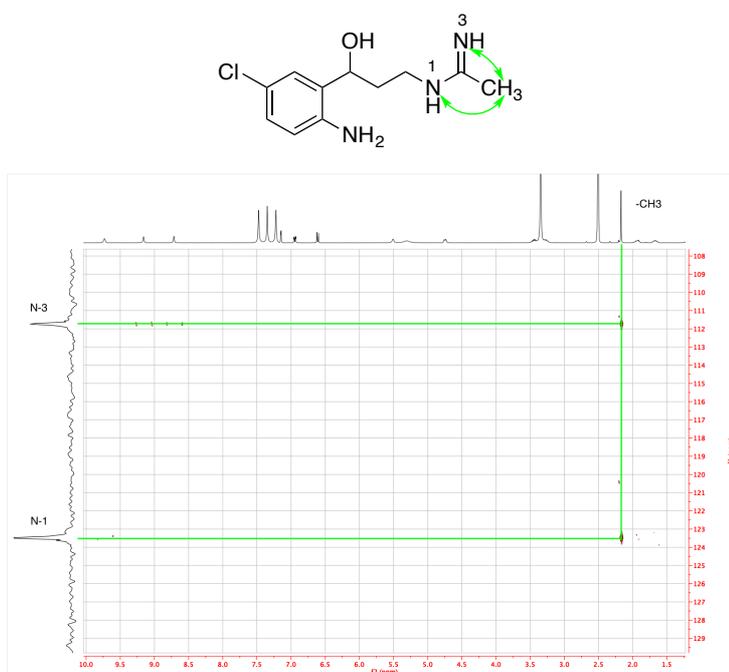
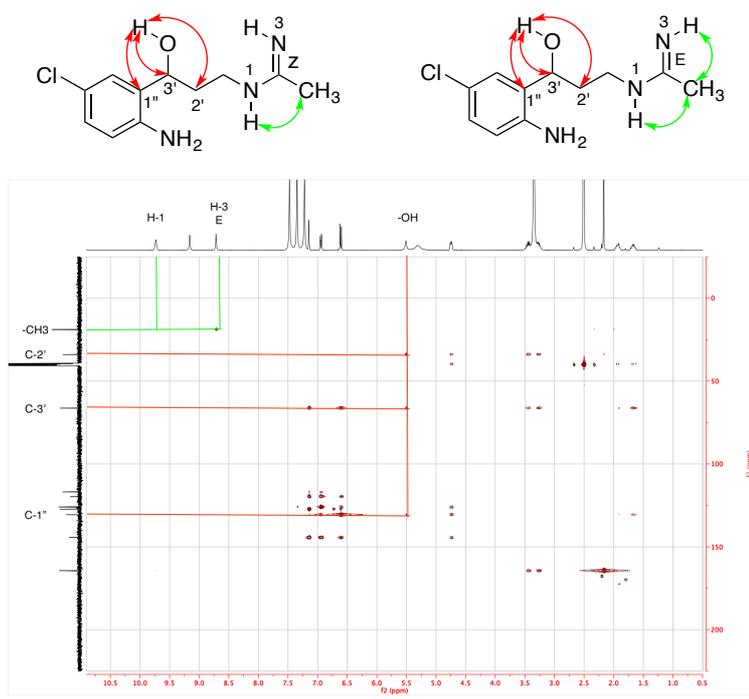


Figura 49. Correlaciones HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de FAB-13 resaltando en verde las interacciones de  $-\text{CH}_3$ .

El HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (Figura 49) mostró la correlación de los protones del metilo con ambos nitrógenos.

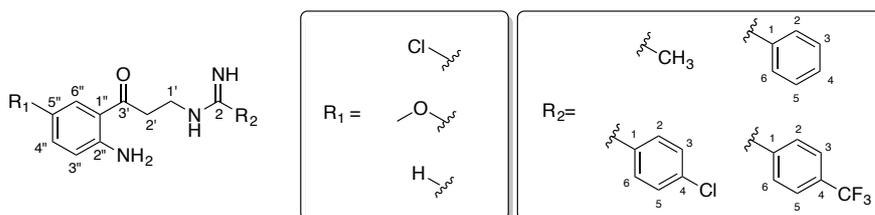


**Figura 50.** Correlaciones HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de **FAB-13**, resaltando las interacciones de  $-\text{CH}_3$  (verde) y de  $-\text{OH}$  (rojo).

La correlación HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Figura 50), permite asignar la señal de  $^1\text{H}$ -RMN del grupo hidroxilo y distinguir entre los dos isómeros geométricos (Z/E) del protón en N-3. También se observó un acoplamiento entre el metilo y el hidrógeno H-1.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los productos finales **FAB-22** – **FAB-29** representados en la tabla 21, al igual que sus precursores, presentan los hidrógenos de la cadena alifática con desplazamientos químicos muy similares. La señal de H-1' suele encontrarse entre  $\delta = 3.91 - 3.47$  ppm, normalmente como triplete con  $J = 7.5 - 6.0$  Hz, salvo en el caso de **FAB-27** y **FAB-29**, donde la señal es un multiplete. La otra señal que se corresponde con esta región es la de H-2', apareciendo entre  $\delta = 3.55 - 2.91$  ppm como un triplete con constante de acoplamiento idéntica a la de H-1', salvo en el caso de **FAB-27** y **FAB-29**, donde también aparece como un multiplete.

**Tabla 21.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H}$ -RMN para los productos finales **FAB-22** – **FAB-29**.



	<b>FAB 22</b>	<b>FAB 23</b>	<b>FAB 24</b>	<b>FAB 25</b>	<b>FAB 26</b>	<b>FAB 27</b>	<b>FAB 28</b>	<b>FAB 29</b>
H-1'	3.64 (t, 6.1)	3.66 (t, 6.1)	3.91 (t, 6.2)	3.89 (t, 6.0)	3.67 (t, 6.1)	3.72 (m)	3.47 (t, 7.5)	3.99 (m)
H-2'	3.35 (t, 6.1)	3.39 (t, 6.1)	3.55 (t, 6.2)	3.35 (t, 6.0)	3.40 (t, 6.1)	3.28 (m)	2.91 (t, 7.5)	3.35 (m)
H-3''	6.79 (d, 8.9)	6.78 (d, 9.0)	6.81 (d, 9.0)	6.85 (d, 9.0)	6.80 (dd, 8.4, 1.2)	6.70 (dd, 8.4, 1.1)	6.69 (d, 8.0)	8.22 (d, 7.6)
H-4''	7.21 (dd, 8.9, 2.4)	7.01 (dd, 9.0, 2.8)	7.05 (dd, 9.0, 2.9)	7.08 (dd, 9.0, 2.7)	7.30 (ddd, 8.4, 6.9, 1.2)	7.18 (ddd, 8.4, 7.0, 1.3)	7.18 (t, 8.0)	7.91 (t, 7.6)
H-5''	-	-	-	-	6.65 (ddd, 8.2, 6.9, 1.2)	6.54 (ddd, 8.2, 7.0, 1.1)	6.54 (t, 8.0)	7.80 (t, 7.6)
H-6''	7.73 (d, 2.4)	7.23 (d, 2.8)	7.30 (d, 2.9)	7.29 (d, 2.7)	7.79 (dd, 8.2, 1.5)	7.72 (dd, 8.2, 1.3)	7.73 (d, 5.8)	7.72 (d, 7.6)
-OCH <sub>3</sub>	-	3.78 (s)	3.82 (s)	3.81 (s)	-	-	-	-
-CH <sub>3</sub>	2.22 (s)	2.23 (s)	-	-	2.24 (s)	-	-	-
R-2 R-6	-	-	7.77 (m)	7.76 (d, 8.5)	-	7.62 (m)	7.54 (d, 8.6)	7.99 (q, 8.8)
R-3 R-5	-	-	7.64 (dd, 10.9, 4.5)	7.66 (d, 8.5)	-	7.48 (dd, 10.8, 4.4)	7.35 (d, 8.6)	
R-4	-	-	7.77 (m)	-	-	7.57 (m)	-	-

Las señales del anillo aromático común a todas estas estructuras se ven influenciadas por el sustituyente que presentan en 5'':

En **FAB-22** el átomo de cloro en 5'' provoca que la señal de H-3'' sea un doblete de  $\delta = 6.79$  ppm que se acopla con H-4'' con  $J = 8.9$  Hz, H-4'' es un doblete a  $\delta = 7.21$  ppm por su acoplamiento con H-3'' ( $J = 8.9$  Hz) y

con H-6'' ( $J = 2.4$  Hz) y, finalmente, H-6'' un doblete a  $\delta = 7.73$  ppm al estar acoplado con H-4'' ( $J = 2.4$  Hz).

Los productos que están metoxilados en posición 5'' (**FAB-23** – **FAB-25**) presentan la misma multiplicidad que el producto anterior, aunque a desplazamientos químicos diferentes: H-3'' es un doblete a  $\delta = 6.85 - 6.78$  ppm que se acopla con H-4'' ( $J = 9.0$  Hz), H-4'' es un doblete a  $\delta = 7.08 - 7.01$  ppm por su acoplamiento con H-3'' ( $J = 9.0$  Hz) y con H-6'' ( $J = 2.9 - 2.7$  Hz) y, finalmente, H-6'' resuena como doblete a  $\delta = 7.30 - 7.23$  ppm que se acopla con H-4'' ( $J = 2.9 - 2.7$  Hz). Los tres protones del grupo metoxilo unido a este anillo aparecen como un singlete a  $\delta = 3.82 - 3.78$  ppm.

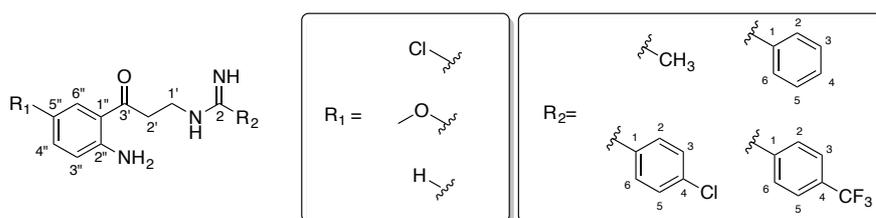
En los compuestos sin sustituyente en 5'' (**FAB-26** – **FAB-29**) existen dos posibilidades:

- Mantener la multiplicidad de las señales como ocurre en **FAB-28** y **FAB-29**, con H-3'' como doblete a  $\delta = 8.22 - 6.69$  ppm que se acopla con H-4'' ( $J = 8.0 - 7.6$  Hz), H-4'' como triplete a  $\delta = 7.91 - 7.18$  ppm por su acoplamiento con H-3'' y H-5'' ( $J = 8.0 - 7.6$  Hz), H-5'' como triplete a  $\delta = 7.80 - 6.54$  ppm por su acoplamiento con H-4'' y H-6'' ( $J = 8.0 - 7.6$  Hz), y finalmente, H-6'' un doblete a  $\delta = 7.73 - 7.72$  ppm que se acopla con H-5'' ( $J = 7.6 - 5.8$  Hz).
- Aumentar la complejidad de las señales como consecuencia de la inclusión de un nuevo protón en el sistema, como se observa en **FAB-26** y **FAB-27**. En ellos, H-3'' pasa a ser un doblete a  $\delta = 6.80 - 6.70$  ppm ( $J = 8.4$  Hz y  $J = 1.2 - 1.1$  Hz); la señal de H-4'' aparece como un doblete a  $\delta = 7.30 - 7.18$  ppm ( $J = 8.4$  Hz,  $J = 7.0 - 6.9$  Hz y  $J = 1.3 - 1.2$  Hz). También aparece como doblete a  $\delta = 6.65 - 6.54$  ppm ( $J = 8.2$  Hz,  $J = 7.0 - 6.9$  Hz y  $J = 1.2 - 1.1$  Hz). Por último, H-6'' se encuentra entre  $\delta = 7.79 - 7.72$  ppm en forma de doblete con  $J = 8.2$  Hz y  $J = 1.5 - 1.3$  Hz.

Los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los productos finales **FAB-22** – **FAB-29** presentan las señales recopiladas en la tabla 22.

El carbono de la función principal de imidamida (C-2), a pesar de conservar la señal entre  $\delta = 166.03 - 164.97$  ppm, deja de ser el carbono más desapantallado en favor de C-3', debido al efecto del grupo carbonilo.

**Tabla 22.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos finales **FAB-22** – **FAB-29**.



	<b>FAB 22</b>	<b>FAB 23</b>	<b>FAB 24</b>	<b>FAB 25</b>	<b>FAB 26</b>	<b>FAB 27</b>	<b>FAB 28</b>	<b>FAB 29</b>
C-2	166.01	166.01	165.88	164.97	166.03	165.62	165.03	165.16
C-1'	38.59	38.73	39.74	47.94	38.72	43.45	40.53	38.68
C-2'	37.46	37.58	37.66	39.70	37.40	39.72	34.90	37.78
C-3'	199.04	199.50	199.81	199.73	199.90	200.56	202.69	201.18
C-1''	120.16	117.82	117.91	117.89	118.05	117.59	136.76	137.81
C-2''	151.38	147.48	147.48	147.51	152.81	152.67	152.54	147.24
C-3''	120.09	120.01	120.05	120.04	118.42	116.30	115.56	125.66
C-4''	135.53	125.13	125.20	125.22	135.75	135.62	134.25	135.76
C-5''	118.36	151.24	151.27	151.28	116.27	118.38	118.04	132.57
C-6''	130.86	113.87	113.94	113.96	131.97	132.10	127.31	128.84
-OCH <sub>3</sub>	-	56.45	56.51	56.50	-	-	-	-
-CH <sub>3</sub>	18.95	18.90	-	-	18.87	-	-	-
R-1	-	-	130.62	130.55	-	131.87	132.23	134.53
R-2 R-6	-	-	130.34	130.76	-	130.18	129.60	130.13
R-3 R-5	-	-	128.94	130.65	-	128.71	129.56	127.23
R-4	-	-	134.60	140.77	-	133.99	137.20	135.78
-CF <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	124.92

Las señales de la cadena propílica se distribuyen entre  $\delta = 47.94 - 38.59$  ppm para C-1',  $\delta = 39.72 - 34.90$  ppm para C-2' y  $\delta = 202.69 - 199.04$  ppm para C-3'.

En el anillo aromático unido a 3', el sustituyente presente en 5'' afecta a los desplazamientos químicos de los carbonos en su entorno:

En **FAB-22**, centrándonos en los carbonos cuaternarios, podemos observar que C-1", conectado con el grupo carbonilo de 3', aparece a  $\delta = 120.16$  ppm; el grupo amino unido a C-2" hace que su desplazamiento químico sea  $\delta = 151.38$  ppm y el cloro unido a C-5" lo hace resonar a  $\delta = 118.36$  ppm. El cloro también afecta a los desplazamientos de los carbonos adyacentes C-4" ( $\delta = 135.53$  ppm) y C-6" ( $\delta = 130.86$  ppm), dejando C-3" a  $\delta = 120.09$  ppm.

Los compuestos metoxilados **FAB-23 – FAB-25**, cambian el entorno de los carbonos cuaternarios: C-1" aparece entre  $\delta = 117.91 – 117.82$  ppm, C-2" entre  $\delta = 147.51 – 147.48$  ppm y C-5" entre  $\delta = 151.28 – 151.24$  ppm. En una franja similar a la del compuesto anterior se mantiene C-3", con  $\delta = 120.05 – 120.01$  ppm, mientras que los carbonos adyacentes al grupo metoxilo, C-4" y C-6", aparecen a  $\delta = 125.22 – 125.13$  ppm y  $\delta = 113.96 – 113.87$  ppm, respectivamente.

Los productos finales sin sustituyentes en 5" **FAB-26 – FAB-29**, presentan una distribución de señales más variada que los compuestos anteriores; así, C-1" puede aparecer entre  $\delta = 118.05 – 117.59$  ppm o  $\delta = 137.81 – 136.76$  ppm, C-2" aparece entre  $\delta = 152.81 – 147.24$  ppm debido a la influencia de NH<sub>2</sub>, C-3" se encuentra entre  $\delta = 125.66 – 115.56$  ppm, C-4" entre  $\delta = 135.76 – 134.25$  ppm, C-5" entre  $\delta = 118.38 – 116.27$  ppm (salvo en **FAB-29** que lo hace a  $\delta = 132.57$  ppm) y, finalmente, C-6" entre  $\delta = 132.10 – 127.31$  ppm.

Las señales que presentan los carbonos de R<sub>2</sub>, tanto intermedios como finales, de esta familia pueden dividirse en:

El grupo metilo, cuyo único carbono aparece entre  $\delta = 19.08 – 17.65$  ppm.

Los derivados con fenilo, donde C-1 es un carbono cuaternario que aparece entre  $\delta = 134.61 – 128.85$  ppm, C-2 y C-6 están entre  $\delta = 130.38 – 128.88$  ppm, C-3 y C-5 en  $\delta = 129.02 – 128.15$  ppm, y finalmente, C-4 se encuentra entre  $\delta = 135.22 – 133.99$  ppm.

Los derivados con *p*-clorofenilo, que presentan dos carbonos cuaternarios: C-1 a  $\delta = 130.54 – 129.19$  ppm y C-4 a  $\delta = 141.67 – 137.20$  ppm; y dos pares de carbonos idénticos C-2 y C-6 a  $\delta = 130.83 – 129.60$  ppm, y C-3 y C-5 a  $\delta = 134.61 – 128.85$  ppm.

Y, por último, los derivados con *p*-trifluorometilfenilo, donde el efecto de los átomos de flúor da lugar a las siguientes señales, C-1 es un carbono

cuaternario que se encuentra entre  $\delta = 134.56 - 133.14$  ppm, C-2 y C-6 aparecen entre  $\delta = 130.13 - 129.40$  ppm, C-3 y C-5 forman un cuadruplete a  $\delta = 127.73 - 125.77$  ppm ( $J = 3.8 - 3.5$  Hz), C-4 es un cuadruplete a  $\delta = 135.75 - 132.72$  ppm ( $J = 33.4 - 32.5$  Hz), finalmente, el carbono directamente unido a los átomos de flúor aparece como cuadruplete entre  $\delta = 124.92 - 123.56$  ppm, con  $J = 272.8 - 271.6$  Hz.

#### 4.3.4. Estudios biológicos

La tabla 23 recoge los resultados del cribado preliminar de inhibición para los compuestos de la familia C, los ensayos se llevaron a cabo a una concentración final de 1 mM en ambas enzimas. El rango de valores obtenidos oscila entre 16.22% y 99.61% en iNOS y entre 7.18% y 89.16% en nNOS.

**Tabla 23.** Porcentajes de inhibición a concentración 1 mM de la familia C.

Compuesto	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	% inhibición iNOS	% inhibición nNOS
<b>FAB-13</b>	OH	Cl	Me	49.11 ± 1.25	66.11 ± 1.17
<b>FAB-14</b>	OH	OMe	Me	57.39 ± 1.42	19.01 ± 2.75
<b>FAB-15</b>	OH	OMe	Ph	95.91 ± 0.27	7.18 ± 3.81
<b>FAB-16</b>	OH	OMe	<i>p</i> -ClPh	81.02 ± 1.80	58.47 ± 0.69
<b>FAB-17</b>	OH	OMe	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> Ph	99.61 ± 0.55	12.50 ± 1.06
<b>FAB-18</b>	OH	H	Me	16.22 ± 1.89	28.26 ± 2.20
<b>FAB-19</b>	OH	H	Ph	64.09 ± 2.63	23.19 ± 1.88
<b>FAB-20</b>	OH	H	<i>p</i> -ClPh	73.17 ± 1.38	31.57 ± 0.82
<b>FAB-21</b>	OH	H	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> Ph	60.50 ± 2.33	36.45 ± 1.49
<b>FAB-22</b>	O	Cl	Me	99.14 ± 0.69	19.88 ± 0.57
<b>FAB-23</b>	O	OMe	Me	97.59 ± 1.24	89.16 ± 0.61
<b>FAB-24</b>	O	OMe	Ph	94.73 ± 0.51	85.86 ± 1.62
<b>FAB-25</b>	O	OMe	<i>p</i> -ClPh	75.12 ± 1.46	86.44 ± 0.99
<b>FAB-26</b>	O	H	Me	22.25 ± 0.84	88.83 ± 0.45
<b>FAB-27</b>	O	H	Ph	35.63 ± 2.25	66.47 ± 1.02
<b>FAB-28</b>	O	H	<i>p</i> -ClPh	33.42 ± 2.48	37.43 ± 1.67
<b>FAB-29</b>	O	H	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> Ph	68.61 ± 1.28	55.98 ± 0.23

A pesar de presentar una horquilla tan grande de porcentajes, podemos afirmar que en la mayoría de estos compuestos prevalece la selectividad iNOS, a excepción de los últimos integrantes de esta familia **FAB-26 – FAB-29**, donde es evidente una mayor inhibición en nNOS.

Se seleccionaron 5 candidatos para el cálculo de su IC<sub>50</sub> en la isoforma inducible y 3 para la isoforma neuronal, la tabla 24 recoge los resultados de dichos ensayos.

**Tabla 24.** Valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la actividad iNOS de los derivados más potentes de la familia C.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) iNOS	IC <sub>50</sub> (μM) nNOS
<b>FAB-15</b>	22.5	> 1000
<b>FAB-17</b>	20.0	> 1000
<b>FAB-22</b>	25.6	> 1000
<b>FAB-23</b>	59.7	223.3
<b>FAB-24</b>	45.2	193.7
<b>FAB-26</b>	> 1000	324.7

Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para iNOS oscilan entre 20.0 y 59.7 μM, estas cifras son significativamente más bajas que en familias anteriores. El inhibidor iNOS más potente de esta familia es **FAB-17**, el 3-hidroxiderivado con un grupo metoxilo en R<sub>1</sub> y *p*-CF<sub>3</sub>Ph en R<sub>2</sub>, presentando además una selectividad mayor de 50 veces iNOS/nNOS.

El buen resultado de **FAB-17** nos motivó a continuar su estudio con ensayos sobre la isoforma endotelial, así se pudo comprobar una ausencia total de efecto inhibitorio más allá del rango de concentraciones en las que se considera efectivo en iNOS.

En el caso de la isoforma neuronal, las IC<sub>50</sub> registradas son sensiblemente superiores a las de iNOS, van desde 193.7 μM en **FAB-24**, hasta 324.7 μM para **FAB-26**, siendo este último el compuesto que mejor inhibe la nNOS de forma selectiva.

#### 4.4. Familia D

##### 4.4.1. Diseño molecular

Continuando con las modificaciones sobre las estructuras que mejores resultados dieron en los ensayos *in vitro*, aparece la familia **D**, donde se

reemplaza el anillo bencénico sustituido de los derivados anteriores, por un resto de piridina.

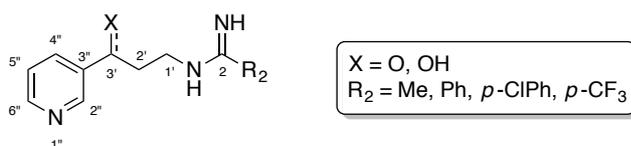
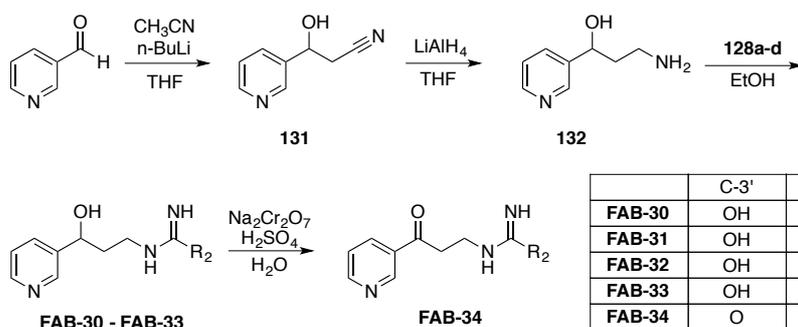


Figura 51. Estructura general de la familia D.

#### 4.4.2. Síntesis química



Esquema 7. Ruta sintética propuesta para la familia D.

El producto de partida utilizado para la preparación de estos derivados es el nicotinaldehído, que es sometido a las mismas condiciones que los nitrobenzaldehídos de la primera reacción de la familia anterior, para dar lugar al nitrilo **131**. La reducción de este a la amina primaria **132** se lleva a cabo, en este caso, por medio de la adición de hidruro de litio y aluminio. A continuación, se procede a la adición de acetimidato de etilo **128a** y los bencimidodtioatos de bencilo **128b-d** para formar el núcleo de imidamida y obtener los productos finales **FAB-30 – FAB-33**. Por último, para la síntesis de **FAB-34**, se procede a la oxidación del grupo hidroxilo de **FAB-30** a cetona, usando una mezcla de dicromato sódico y ácido sulfúrico en medio acuoso. La presencia de solo un compuesto con grupo carboxilo se debe a una serie de problemas<sup>170</sup> que se de tallan en la próxima familia.

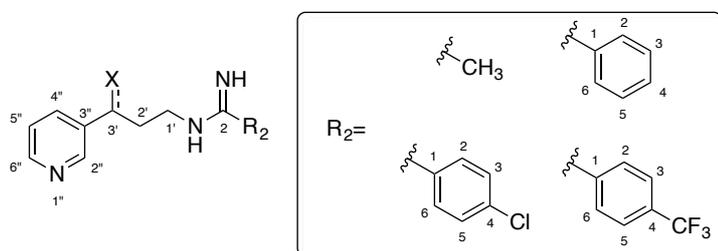
#### 4.4.3. Análisis espectroscópico

El disolvente utilizado en este caso para diluir las muestras fue el metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD).

La numeración de la estructura común a todos estos compuestos sigue las reglas establecidas por la IUPAC, comenzando por la función principal de

imidamida, seguida de la cadena alifática y después el anillo de piridina. Para facilitar el trabajo se ha decidido numerar los sustituyentes R<sub>2</sub> por separado.

**Tabla 25.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de <sup>1</sup>H-RMN para los productos finales **FAB-30** – **FAB-34**.



	<b>FAB-30</b>	<b>FAB-31</b>	<b>FAB-32</b>	<b>FAB-33</b>	<b>FAB-34</b>
H-1'	3.38 (m)	3.72 (m)	3.68 (m)	3.74 (m)	3.69 (q, 5.8)
H-2'	1.97 (m)	2.21 (m)	2.18 (m)	2.23 (m)	3.26 (t, 5.5)
H-3'	4.78 (dd, 8.6, 4.6)	5.00 (dd, 9.1, 4.1)	4.98 (dd, 9.1, 4.0)	5.00 (dd, 9.0, 4.1)	-
H-2''	8.51 (d, 2.0)	8.65 (d, 2.0)	8.61 (d, 2.2)	8.65 (d, 2.2)	9.17 (d, 1.7)
H-4''	7.83 (dt, 8.0, 2.0)	7.98 (dt, 7.9, 2.0)	7.94 (dddd, 7.9, 2.2, 1.6, 0.6)	7.99 (m)	8.22 (dt, 8.0, 1.7)
H-5''	7.38 (ddd, 8.0, 4.9, 0.9)	7.48 (ddd, 7.9, 4.9, 0.9)	7.42 (ddd, 8.0, 4.9, 0.6)	7.49 (ddd, 7.8, 4.9, 0.8)	7.44 (dd, 8.0, 4.8)
H-6''	8.40 (dd, 4.9, 2.0)	8.48 (dd, 4.9, 2.0)	8.41 (dd, 4.9, 1.6)	8.49 (dd, 4.9, 1.6)	8.80 (dd, 4.8, 1.7)
R-2, R-6	-	7.79 (m)	7.77 (d, 8.9)	7.97 (q, 8.2)	-
R-3, R-5	-	7.64 (m)	7.59 (d, 8.9)		-
R-4	-	7.75 (tt, 7.5, 1.3)	-	-	-
CH <sub>3</sub>	2.16 (s)	-	-	-	1.96 (s)

En el estudio de <sup>1</sup>H-RMN, comenzaremos por las señales correspondientes a la cadena alifática de los derivados hidroxilados (**FAB-30** – **FAB-33**):

Los dos átomos H-1' aparecen como multipletes con desplazamientos químicos comprendidos entre 3.74 y 3.38 ppm, y una amplitud media de 0.20 ppm. Los dos átomos de H-2', aparecen como multipletes algo más apantallados, entre  $\delta$  = 2.23 – 1.97 ppm, y amplitud media de 0.20 ppm. Por último, el protón de H-3' aparece como doble doblete entre  $\delta$  = 5.00 – 4.78 ppm ( $J$  = 9.1 – 8.6, 4.6 – 4.1 Hz).

La cadena alifática de **FAB-34** difiere de las anteriores en la presencia de un cabonilo en posición 3', modificando las señales de H-1' (ahora un cuadruplete a  $\delta = 3.69$  ppm y  $J = 5.8$  Hz) y H-2' (un triplete a  $\delta = 3.26$  ppm y  $J = 5.5$  Hz), mientras que H-3' desaparece.

El anillo de piridina presenta en esta familia desplazamientos químicos muy similares:

El protón de H-2'' aparece como doblete en **FAB-30** – **FAB-33**, de  $\delta = 8.65$  –  $8.51$  ppm y  $J = 2.2$  –  $2.0$  Hz, por su acoplamiento con H-4''. En **FAB-34** es un doblete más desapantallado, a  $\delta = 9.17$  ppm y  $J = 1.7$  Hz, por su acoplamiento con H-4''.

La señal correspondiente a H-4'' es más compleja: aparece como doble triplete en **FAB-30** y **FAB-31** a  $\delta = 7.98$  –  $7.83$  ppm, acoplándose con  $J = 8.0$  –  $7.9$  Hz a H-5'' y  $J = 2.0$  Hz a H-4'' y H-6''; como doble doblete en **FAB-32** a  $\delta = 7.94$  ppm, acoplándose con  $J = 7.9$  Hz a H-5'',  $J = 2.2$  Hz a H-2'',  $J = 1.6$  Hz a H-6'' y  $J = 0.6$  Hz; y como multiplete en **FAB-33** a  $\delta = 7.99$  ppm. En **FAB-34** aparece como un doble triplete a  $\delta = 8.22$  ppm, acoplándose con H-5'' ( $J = 8.0$  Hz) y con H-4'' y H-6'' ( $J = 1.7$  Hz).

En el caso de H-5'' la señal que muestra en **FAB-30** – **FAB-33** es un doble doblete a  $\delta = 7.49$  –  $7.38$  ppm, con tres contantes de acoplamiento,  $J = 8.0$  –  $7.8$  Hz con H-4'',  $J = 4.9$  Hz con H-6'' y  $J = 0.9$  –  $0.6$  Hz. En **FAB-34** la señal aparece a  $\delta = 7.44$  ppm y es un doble doblete con acoplamientos:  $J = 8.0$  Hz con H-4'' y  $J = 4.8$  Hz con H-6''.

El ultimo protón del anillo de piridina (H-6'') aparece como doble doblete entre  $\delta = 8.80$  –  $8.40$  ppm, acoplándose con  $J = 4.9$  –  $4.8$  Hz a H-5'' y  $J = 2.0$  –  $1.6$  Hz a H-4''.

Quedan por aclarar los protones de cada uno de los sustituyentes en R<sub>2</sub>:

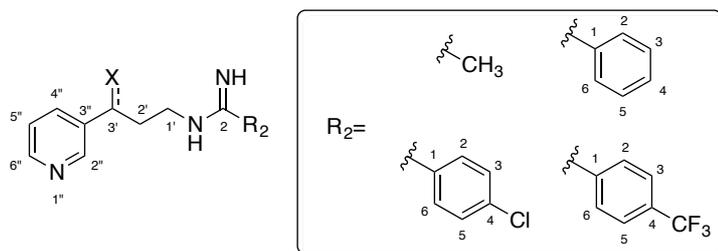
En **FAB-30** los 3 protones del grupo metilo aparecen como singlete a  $\delta = 2.16$  ppm, y **FAB-34** presenta esta misma señal a  $\delta = 1.96$  ppm.

En **FAB-31** el anillo de benceno presenta tres señales distintas, un multiplete con  $\delta = 7.79$  ppm correspondiente a los protones en posición 2 y 6; un triple triplete a  $\delta = 7.75$  ppm de H-4 con ( $J = 7.5, 1.3$  Hz) y un segundo multiplete a  $\delta = 7.64$  ppm que incluye los protones 3 y 5 restantes.

En **FAB-32** el anillo de benceno está sustituido en posición 4 por un átomo de cloro, esto se traduce en la aparición de dos señales en el espectro: un doblete a  $\delta = 7.77$  ppm, correspondiente a los protones en posición 2 y 6, y otro doblete a  $\delta = 7.59$  ppm de los protones 3 y 5. En ambos casos, la constante de acoplamiento observada es  $J = 8.9$  Hz, debido a los acoplamientos entre los dos pares de protones.

En **FAB-33** el anillo de benceno está sustituido en posición *para* por un grupo trifluorometilo, que hace converger las señales de los cuatro protones 2, 3, 5 y 6 en un único cuadruplete a  $\delta = 7.97$  ppm, con una  $J = 8.2$  Hz.

**Tabla 26.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos finales **FAB-30** – **FAB-34**.



	<b>FAB-30</b>	<b>FAB-31</b>	<b>FAB-32</b>	<b>FAB-33</b>	<b>FAB-34</b>
C-2	163.79	165.86	164.70	164.93	170.35
C-1'	38.89	41.54	41.64	41.73	34.22
C-2'	36.80	37.43	37.34	37.36	38.72
C-3'	67.28	69.99	69.80	69.96	198.66
C-2''	148.02	148.00	147.92	149.12	154.10
C-3''	140.92	142.18	142.06	142.21	131.82
C-4''	133.35	135.90	135.92	135.92	135.43
C-5''	123.30	125.26	125.21	125.29	123.85
C-6''	147.46	149.06	148.90	148.03	149.78
R-1	-	130.50	140.63	134.33	-
R-2, R-6	-	128.95	130.84	130.14	-
R-3, R-5	-	130.39	130.49	127.26	-
R-4	-	134.66	128.85	135.74	-
CF <sub>3</sub>	-	-	-	124.90	-
CH <sub>3</sub>	18.47	-	-	-	23.47

Para los espectros  $^{13}\text{C}$ -RMN, recogidos en la tabla 26, dividiremos las señales entre el esqueleto principal de la familia y los diferentes sustituyentes de cada uno.

En los derivados hidroxilados (**FAB-30** – **FAB-33**), el carbono en posición 2 es el más desapantallado por tratarse de un carbono cuaternario situado entre dos nitrógenos, aparece con  $\delta = 165.86 - 163.79$  ppm.

Continuando con la cadena alifática, C-1' se encuentra entre  $\delta = 41.73 - 38.89$  ppm, C-2' entre  $\delta = 37.43 - 36.80$  ppm y C-3' está más desapantallado debido a la influencia del hidroxilo, resonando a  $\delta = 69.99 - 67.28$  ppm.

En el caso de **FAB-34**, C-2 tiene un  $\delta = 170.35$  ppm, pero no es el carbono más a la izquierda, puesto que C-3' pasa a formar parte de un grupo carbonilo, siendo su desplazamiento químico de  $\delta = 198.66$  ppm, finalmente, C-1' y C-2' resuenan a  $\delta = 34.22$  ppm y  $\delta = 38.72$  ppm, respectivamente.

Pasando a la zona aromática de los compuestos de esta familia, C-2'' aparece entre  $\delta = 149.12 - 147.92$  ppm en **FAB-30** – **FAB-33** y a  $\delta = 154.10$  ppm en **FAB-34**, debido al efecto del grupo carbonilo. El carbono cuaternario que conecta con la cadena alifática C-3'' fluctúa entre  $\delta = 142.21 - 131.82$  ppm. Los siguientes carbonos son más estables: C-4'' tiene un  $\delta = 135.92 - 133.35$  ppm, C-5'' resuena a  $\delta = 125.29 - 123.30$  ppm y C-6'' a  $\delta = 149.78 - 147.46$  ppm.

Por último, queda discernir los carbonos de los sustituyentes en  $\text{R}_2$ :

En el caso de los compuestos con metilo, en **FAB-30** aparece a  $\delta = 18.47$  ppm y en **FAB-34** a  $\delta = 23.47$  ppm.

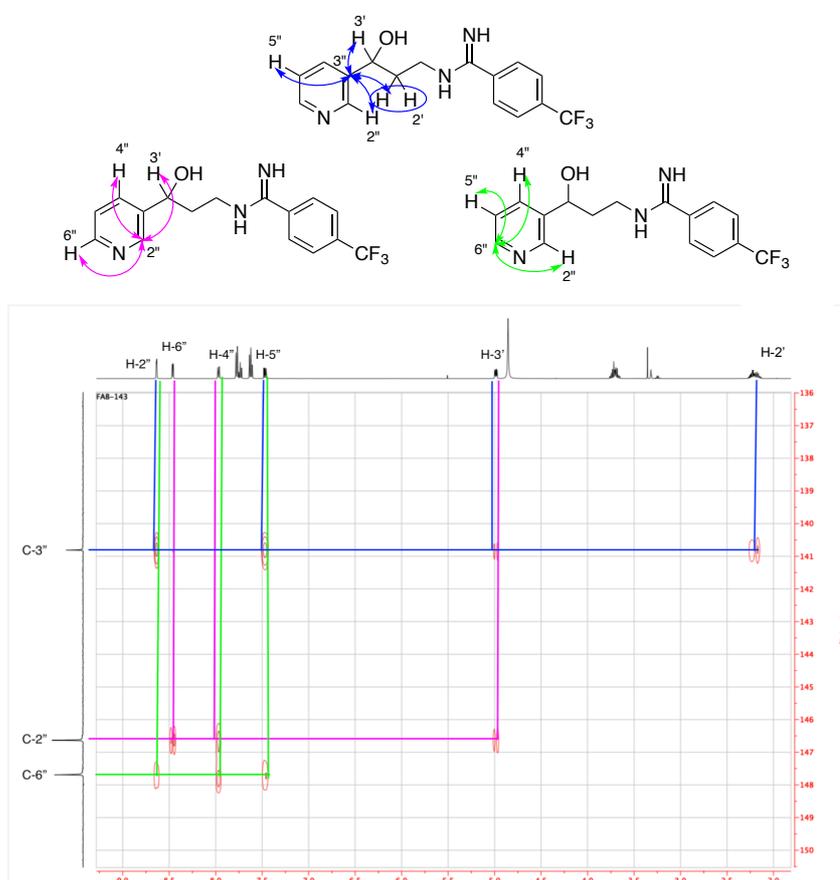
En **FAB-31** los carbonos del anillo aromático tienen los siguientes desplazamientos químicos: C-1,  $\delta = 130.50$  ppm; C-2 y C-6,  $\delta = 128.95$  ppm; C-3 y C-5,  $\delta = 130.39$  ppm; y C-4,  $\delta = 134.66$  ppm.

En **FAB-32** la presencia de un átomo de cloro en posición 4 altera las señales de carbono del anillo aromático: C-1,  $\delta = 140.63$  ppm; C-2 y C-6,  $\delta = 130.84$  ppm; C-3 y C-5,  $\delta = 130.49$  ppm; y C-4,  $\delta = 128.85$  ppm.

En **FAB-33** el anillo aromático cuenta con un grupo trifluorometilo que aparece a  $\delta = 124.90$  ppm con una multiplicidad de cuadruplete ( $J = 272.1$  Hz) e influye sobre el resto de señales del anillo: C-1,  $\delta = 134.33$  ppm; C-2

y C-6,  $\delta = 130.14$  ppm; C-3 y C-5,  $\delta = 127.26$  ppm en forma de cuadruplete ( $J = 3.8$  Hz); y C-4,  $\delta = 135.74$  ppm en forma de cuadruplete ( $J = 33.0$  Hz).

Los estudios bidimensionales realizados a este compuesto permitieron asignar todas las señales del nuevo anillo de piridina, siendo de especial utilidad en la identificación de C-3'' y en la diferenciación entre C-2'' y C-6''.



**Figura 52.** Correlaciones HMBC para los C-2'' (rosa), C-3'' (azul) y C-6'' (verde) de **FAB-33**.

En la figura 52 podemos observar las correlaciones entre los carbonos mencionados anteriormente y los protones de su entorno: C-3'' muestra correlación con H-3', H-2'', H-5'' y con los dos protones de H-2'; C-2'' se correlaciona con H-3', H-4'' y H-6''; mientras que C-6'' lo hace con H-2'', H-4'' y H-5''.

#### 4.4.4. Estudios biológicos

Con el fin de determinar la potencia inhibitoria de los derivados de esta familia, se ensayaron a una concentración de 1 mM sobre las isoformas inducible y neuronal de la NOS.

Los resultados se recogen en la tabla 27, donde los porcentajes de inhibición en iNOS varían entre 13.28% y 94.02%, mientras que los de nNOS se encuentran entre 13.08% y 69.44%. Esta tabla también permite apreciar una mayor selectividad por iNOS en los derivados con un grupo hidroxilo en 3', mientras que el único candidato con un resto carbonilo presenta un mayor porcentaje de inhibición nNOS.

**Tabla 27.** Porcentajes de inhibición a concentración 1 mM de la familia **D**.

Compuesto	X	R <sub>2</sub>	% inhibición iNOS	% inhibición nNOS
<b>FAB-30</b>	OH	Me	92.49 ± 1.49	13.08 ± 2.59
<b>FAB-31</b>	OH	Ph	94.02 ± 1.97	20.53 ± 2.07
<b>FAB-32</b>	OH	<i>p</i> -ClPh	77.90 ± 1.87	53.61 ± 1.80
<b>FAB-33</b>	OH	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> Ph	28.98 ± 0.87	12.27 ± 0.39
<b>FAB-34</b>	O	Me	13.28 ± 1.78	69.44 ± 0.47

Los elevados porcentajes de inhibición que presentaban **FAB-30** y **FAB-31** en iNOS, fueron determinantes a la hora de seleccionarlos para el cálculo de sus IC<sub>50</sub>. El compuesto final con un metilo en R<sub>2</sub> (**FAB-30**) resultó ser el mejor inhibidor hasta la fecha en nuestro grupo de investigación, con IC<sub>50</sub> = 4.6 μM y una selectividad de más de 200 veces sobre nNOS.

**Tabla 28.** Valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la actividad iNOS de los derivados más potentes de la familia **D**.

iNOS	
Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>FAB-30</b>	4.6
<b>FAB-31</b>	76.0

El buen resultado de **FAB-30** nos motivó a continuar su estudio con ensayos sobre la isoforma endotelial, así se pudo comprobar una ausencia total de efecto inhibitorio más allá del rango de concentraciones en las que se considera efectivo en iNOS.

## 4.5. Familia E

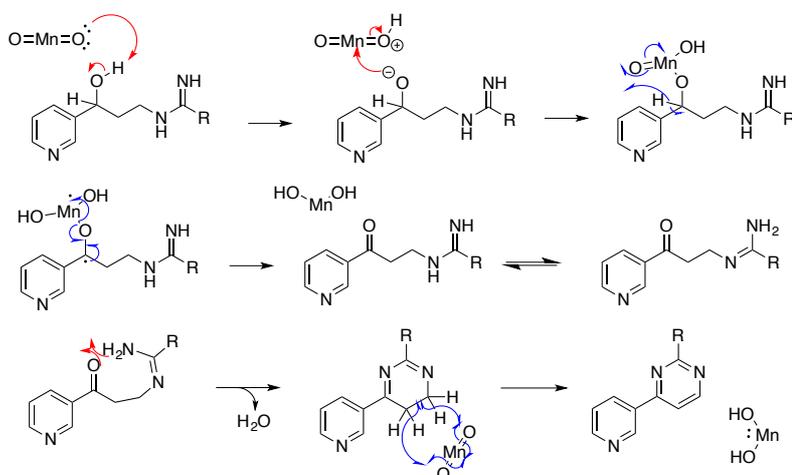
### 4.5.1. Diseño molecular

El desarrollo de esta familia se debe a una serie de resultados anómalos a la hora de oxidar el grupo hidroxilo de los derivados **FAB-30 – FAB-33**.

En la familia **D**, solo se consiguió obtener un derivado con grupo carbonilo en posición 3'. Además, el rendimiento de la reacción de oxidación resultaba muy discreto respecto a sus análogos de la familia **C**, lo que nos llevó a pensar que la presencia del anillo de piridina interferiría con la acción oxidante del Cr (VI).

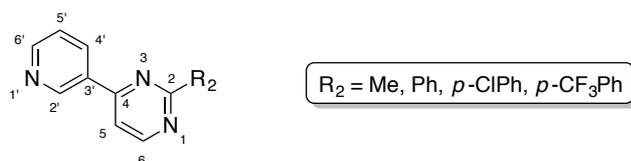
El carácter ligeramente básico del anillo de piridina unido a la presencia de ácido crómico da lugar a la formación de aductos en los que interviene un enlace N-Cr. Por lo tanto, decidimos sustituir el agente oxidante por  $\text{MnO}_2$ , un reactivo oxidante selectivo para la posición alílica. A pesar de que parecía la opción más clara, no se mejoraron los rendimientos previos, debido a la aparición de una estructura diferente a la esperada.

De forma sorprendente, e independientemente del reactivo oxidante utilizado, se produce una ciclación de la cadena alquílica involucrando también la función imidamida, para dar lugar a un anillo de pirimidina. El uso de  $\text{MnO}_2$  fuerza la aromatización y permite aislar compuestos estables en lugar de intermedios inestables.



**Esquema 8.** Mecanismo propuesto para la ciclación de pirimidinas.

Estos derivados poseen cierta similitud con los inhibidores de NOS **99 - 101** de McMillan et al.<sup>147</sup>, lo que nos motivó a darles una oportunidad en nuestros ensayos de actividad.



**Figura 53.** Estructura general de los compuestos de la familia E.

#### 4.5.2. Síntesis química



**Esquema 9.** Ruta sintética propuesta para la familia E.

Esta familia de compuestos sigue una ruta sintética idéntica a la anterior, variando únicamente el último paso, donde los productos finales **FAB-30 – FAB-33**, se tratan con dióxido de manganeso en acetonitrilo. Esto induce la formación y aromatización del anillo de pirimidina para dar lugar a los derivados finales **FAB-35 – FAB-38**.

#### 4.5.3. Análisis espectroscópico

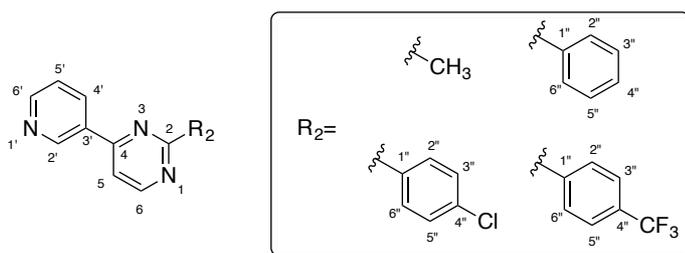
Todos los espectros se realizaron utilizando cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como disolvente.

La numeración de estos compuestos sigue las reglas establecidas por la IUPAC, comenzando por el anillo de pirimidina, a continuación el anillo de piridina y por último los diferentes R<sub>2</sub>.

En el análisis los espectros de <sup>1</sup>H-RMN (Tabla 29) comenzaremos por las dos señales del anillo de pirimidina:

El protón en posición 5 aparece como un doblete a  $\delta = 7.69 - 7.55$  y una  $J = 5.3 - 5.2$  Hz, por su acoplamiento con H-6. La segunda señal, correspondiente con H-6, aparece como doblete a  $\delta = 8.92 - 8.73$  y una  $J = 5.3 - 5.2$  Hz, por su acoplamiento con H-5.

**Tabla 29.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H}$ -RMN para los productos finales **FAB-35** – **FAB-38**.



	<b>FAB-35</b>	<b>FAB-36</b>	<b>FAB-37</b>	<b>FAB-38</b>
H-5	7.55 (d, 5.3)	7.63 (d, 5.2)	7.65 (d, 5.2)	7.69 (d, 5.2)
H-6	8.73 (d, 5.3)	8.90 (d, 5.2)	8.89 (d, 5.2)	8.92 (d, 5.2)
H-2'	9.26 (s)	9.40 (d, 1.7)	9.39 (d, 1.0)	9.41 (d, 1.9)
H-4'	8.42 (dt, 8.0, 1.9)	8.56 (m)	8.53 (m)	8.56 (dt, 8.0, 1.9)
H-5'	7.45 (dd, 8.0, 4.9)	7.49 (ddd, 8.0, 4.8, 1.7)	7.50 (m)	7.53 (dd, 8.0, 4.9)
H-6'	8.73 (d, 5.3)	8.77 (dd, 4.8, 1.7)	8.78 (dd, 4.5, 0.9)	8.79 (dd, 4.9, 1.9)
H-2'', H-6''	-	8.56 (m)	8.53 (m)	8.68 (d, 8.3)
H-3'', H-5''	-	7.53 (m)	7.50 (m)	7.77 (d, 8.3)
H-4''	-		-	-
CH <sub>3</sub>	2.82 (s)	-	-	-

En el anillo de piridina, la señal de H-2' se puede observar en **FAB-35** como singlete a  $\delta = 9.26$  ppm, mientras que en el resto de compuestos aparece como doblete a  $\delta = 9.41 - 9.39$  ppm y una  $J = 1.9 - 1.0$  Hz por su acoplamiento con H-6' ó H-4'. La señal de H-4' puede observarse en **FAB-35** y **FAB-37** como un doble triplete a  $\delta = 8.56 - 8.42$  ppm con dos constantes de acoplamiento:  $J = 8.0$  Hz para H-5' y  $J = 1.9$  Hz para H-2' y H-6'; en los otros dos compuestos esta señal es un multiplete a  $\delta = 8.56 - 8.53$  ppm. El protón de H-5' muestra una multiplicidad diferente según el compuesto, en **FAB-35** y **FAB-38** se trata de un doble doblete con  $\delta = 7.53 - 7.45$  ppm por su acoplamiento con H-4' ( $J = 8.0$  Hz) y con H-6' ( $J = 4.9$  Hz); en **FAB-36** aparece como un doble doblete con  $\delta = 7.49$  ppm, acoplado con H-4' ( $J = 8.0$  Hz), con H-6' ( $J = 4.8$  Hz) y con H-2' ( $J = 1.7$  Hz). El último de los protones de este anillo, H-6', en **FAB-35** coincide con la señal de H-6 del anillo de pirimidina, un doblete a  $\delta = 8.73$  ppm y  $J = 5.3$

Hz; en el resto de casos aparece como un doble doblete a  $\delta = 8.79 - 8.77$  ppm, por su acoplamiento con H-5' ( $J = 4.9 - 4.5$  Hz) y con H-2' ( $J = 1.9 - 0.9$  Hz).

En el apartado de los diferentes radicales  $R_2$  podemos diferenciar las siguientes señales:

En **FAB-35**, los tres protones del grupo metilo aparecen como un singlete a  $\delta = 2.82$  ppm.

En **FAB-36**, el anillo aromático muestra dos multipletes, uno comprendido entre  $\delta = 8.60 - 8.53$  ppm correspondiente a H-2'' y H-6'', y otro a  $\delta = 7.55 - 7.51$  ppm que incluye los protones de H-3'', H-4'' y H-5''.

En **FAB-37**, las señales del anillo aromático aparecen como multipletes, uno a  $\delta = 8.57 - 8.49$  ppm correspondiente a H-2'' y H-6'', y el otro a  $\delta = 7.54 - 7.47$  ppm para H-3'' y H-5''.

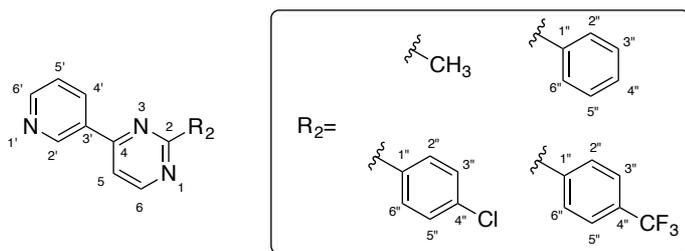
Por último, el anillo aromático de **FAB-38**, muestra un doblete a  $\delta = 8.68$  ppm que se corresponde con H-2'' y H-6'', con una  $J = 8.3$  Hz por su acoplamiento con H-3'' y H-5'', y otro doblete a  $\delta = 7.77$  ppm que se corresponde con H-3'' y H-5'', con  $J = 8.3$  Hz, por su acoplamiento con H-2'' y H-6''.

Comenzaremos el estudio de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN por el anillo de pirimidina, cuyas señales se recogen en la tabla 30.

El carbono en posición 2 es el que se encuentra más desapantallado en todos los casos, con un desplazamiento químico que oscila entre  $\delta = 169.02 - 163.76$  ppm, a continuación, aparece C-4 con  $\delta = 161.90 - 161.78$  ppm. Dejando a un lado estos dos carbonos cuaternarios, C-5 aparece a  $\delta = 115.40 - 114.12$  ppm y C-6 a  $\delta = 158.61 - 158.02$  ppm.

En el anillo de piridina, C-2' puede observarse con  $\delta = 148.75 - 148.29$  ppm; C-3' entre  $\delta = 132.83 - 132.69$  ppm, con C-4' muy próximo a  $\delta = 135.22 - 134.83$  ppm; C-5' aparece con  $\delta = 124.15 - 123.93$  ppm y C-6' es la señal más desapantallada de este anillo con  $\delta = 151.76 - 151.51$  ppm.

**Tabla 30.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos finales **FAB-35** – **FAB-38**.



	<b>FAB-35</b>	<b>FAB-36</b>	<b>FAB-37</b>	<b>FAB-38</b>
C-2	169.02	165.09	164.16	163.76
C-4	161.85	161.78	161.90	161.78
C-5	114.12	114.69	114.88	115.40
C-6	158.02	158.41	158.46	158.61
C-2'	148.70	148.75	148.73	148.29
C-3'	132.81	132.83	132.68	132.69
C-4'	134.85	134.84	134.83	135.22
C-5'	123.93	123.94	123.97	124.15
C-6'	151.76	151.83	151.93	151.51
C-1''	-	137.61	136.11	140.77
C-2'', C-6''	-	128.78	129.83	128.76
C-3'', C-5''	-	128.48	129.01	125.68
C-4''	-	131.16	137.43	132.71
CF <sub>3</sub>	-	-	-	124.24
CH <sub>3</sub>	26.41	-	-	-

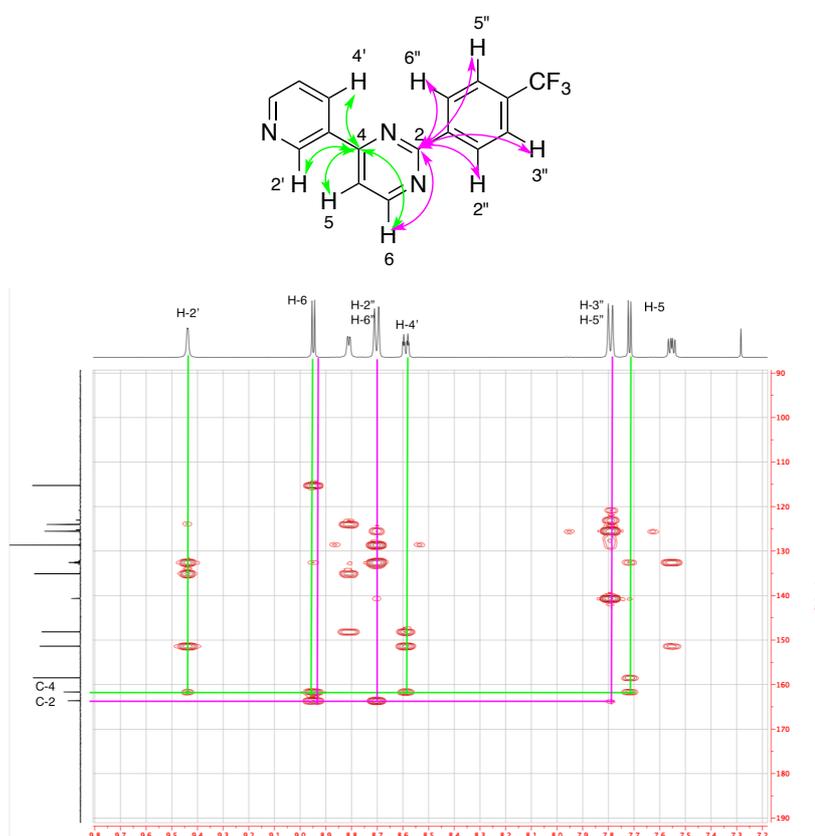
En relación a los sustituyentes de  $\text{R}_2$  se puede observar lo siguiente:

El metilo de **FAB-35** aparece con  $\delta = 26.41$  ppm.

En **FAB-36** el anillo aromático muestra los siguientes desplazamientos químicos: C-1'' con  $\delta = 137.61$  ppm; C-2'' y C-6'' a  $\delta = 128.78$  ppm; C-3'' y C-5'' a  $\delta = 128.48$  ppm y, finalmente, C-4'' con  $\delta = 131.16$  ppm.

En **FAB-37**, debido la posición del átomo de cloro, la única gran diferencia con el compuesto anterior aparece en C-4'', donde el desplazamiento químico alcanza  $\delta = 137.43$  ppm como carbono cuaternario. El resto de señales son C-1'' con  $\delta = 136.11$  ppm, C-2'' y C-6'' con  $\delta = 129.83$  ppm y C-3'' y C-5'' a  $\delta = 129.01$  ppm.

En **FAB-38** influye en gran medida el grupo trifluorometilo en posición 4'', donde el carbono unido a tres átomos de flúor aparece como cuadruplete a  $\delta = 124.24$  ppm, con una  $J = 272.4$  Hz. La influencia de  $CF_3$  crea otros dos cuadrupletes: el carbono unido directamente a él (C-4'' a  $\delta = 132.71$  ppm,  $J = 32.3$  Hz) y los dos adyacentes a este (C-3'' y C-5'' con  $\delta = 125.68$  ppm,  $J = 3.9$  Hz). El resto de señales son C-1'' a  $\delta = 140.77$  ppm y C-2'' y C-6'' a  $\delta = 128.76$  ppm.



**Figura 54.** Correlaciones HMBC para los C-2 (rosa) y C-4 (verde) de **FAB-38**.

Los estudios de RMN bidimensionales realizados sobre **FAB-38** nos permitieron confirmar la creación del anillo de pirimidina y, al mismo tiempo, fueron de gran utilidad para la asignación de cada una de las señales en los espectros de  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN.

La diferenciación entre C-2 y C-4, las dos señales más desapantalladas, es posible gracias a las correlaciones con los carbonos de los anillos adyacentes (Figura 54).

#### 4.5.4. Estudios biológicos

El estudio preliminar de los porcentajes de inhibición a 1 mM sobre las isoformas neuronal e inducible de la NOS presentó los resultados recogidos en la tabla 31.

**Tabla 31.** Porcentajes de inhibición a concentración 1 mM de la familia E.

Compuesto	R <sub>2</sub>	% inhibición iNOS	% inhibición nNOS
<b>FAB-35</b>	Me	26.78 ± 0.84	57.15 ± 1.28
<b>FAB-36</b>	Ph	0.29 ± 0.42	45.66 ± 2.13
<b>FAB-37</b>	<i>p</i> -ClPh	33.33 ± 3.36	30.44 ± 4.27
<b>FAB-38</b>	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> Ph	67.85 ± 3.87	63.00 ± 4.41

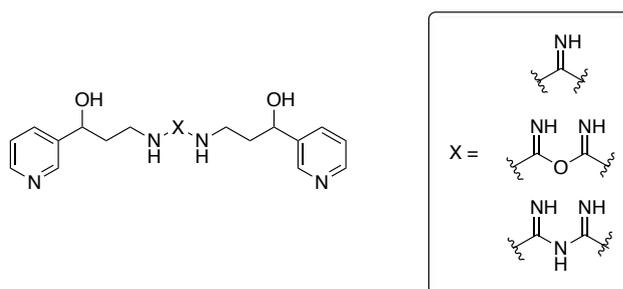
Los valores de inhibición para iNOS se encuentran entre 0.29% y 67.85%, mientras que los de nNOS están comprendidos entre 30.44% y 63.00%. En ambas isoformas el compuesto que presentó un mayor porcentaje de inhibición fue **FAB-38**.

Debido a los bajos valores de inhibición y la escasa selectividad entre isoformas, en este caso, ninguno de los candidatos resultó interesante para el cálculo de su IC<sub>50</sub>.

#### 4.6. Familia F

##### 4.6.1. Diseño molecular

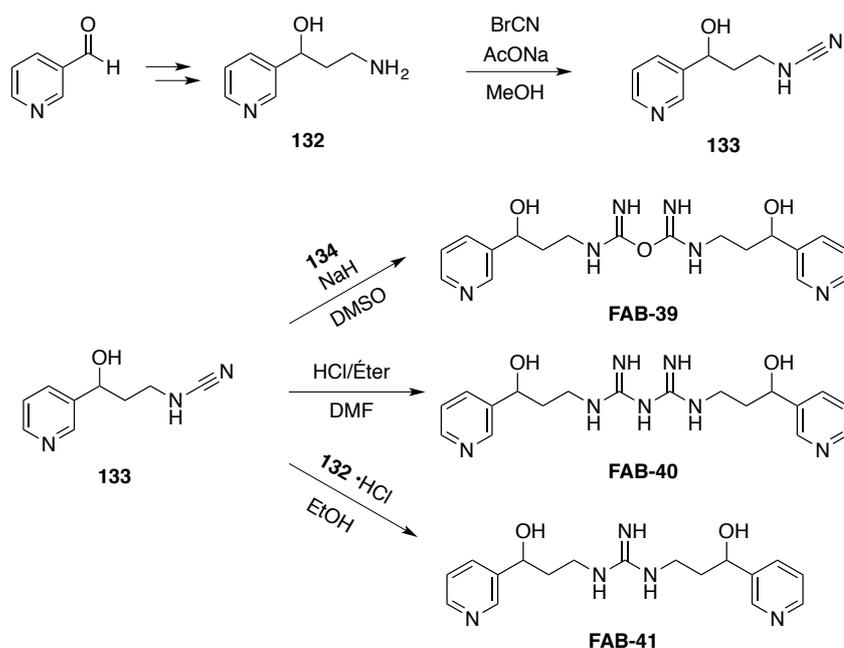
Atendiendo al alto número de inhibidores potentes de NOS que presentan simetría en su estructura: **18 - 20** (Fig. 8, pag. 36)<sup>91</sup>, **32 - 33** (Fig. 11, pag. 39)<sup>104</sup> y **75 - 79** (Fig. 25, pag. 53)<sup>136</sup>, decidimos emular la misma estrategia en nuestros compuestos.



**Figura 55.** Estructura general de los compuestos de la familia F.

Cada molécula de esta familia consta de dos extremos formados por anillos de piridina, estos se unen a través de cadenas 3-hidroxipropílicas a un núcleo central que supone el factor diferencial entre ellas. En un primer lugar, se buscaba obtener un núcleo central guanidina, pero durante las diversas pruebas para sintetizarlo aparecieron el resto de derivados, que resultaban igual de interesantes de cara a los ensayos biológicos.

#### 4.6.2. Síntesis química



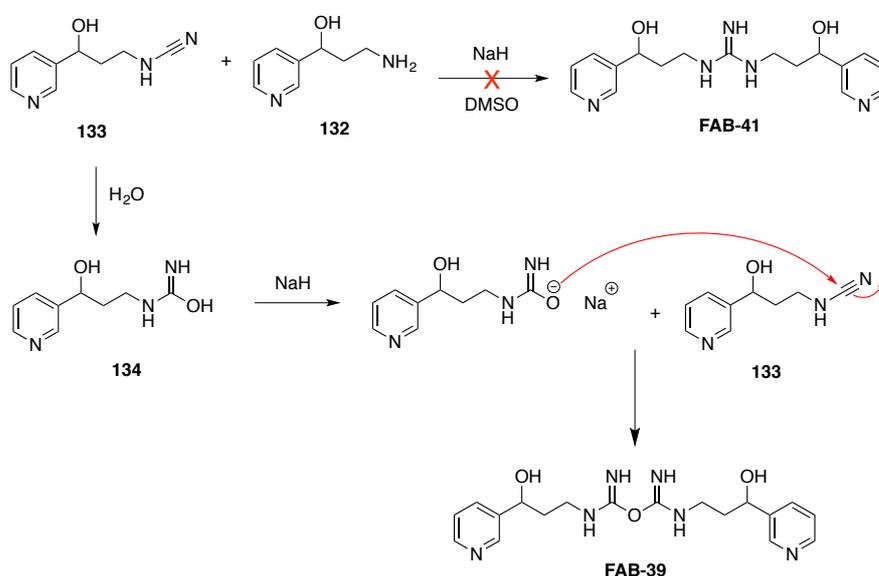
**Esquema 10.** Ruta sintética propuesta para la familia F.

En esta ruta sintética se parte de nicotinaldehído, este es sometido a las dos primeras reacciones en condiciones idénticas a las de la familia D, obteniendo la amina **132**.

A continuación, mediante el uso de bromuro de cianógeno, se introduce la función cianamida dando lugar a **133**. Este intermedio es el que nos permite la dimerización para conseguir los productos finales.

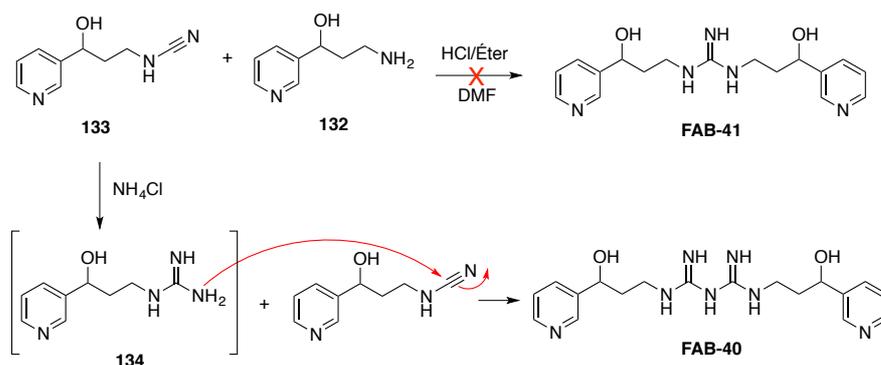
En la primera aproximación a la síntesis de **FAB-41**, siguiendo las indicaciones de Clark et al.<sup>171</sup>, se utilizó hidruro de sodio para activar la amina y DMSO como disolvente. El resultado no fue la guanidina esperada,

sino que se obtuvo el imidocarbamato **FAB-39** como producto mayoritario. La explicación más probable es que estas reacciones son muy sensibles a la presencia de H<sub>2</sub>O, por lo que las trazas de agua presentes en el DMSO habrían reaccionado con **133** para dar lugar al ácido **134**; posteriormente, la adición de NaH al medio de reacción permite la unión con otra molécula de **133**.



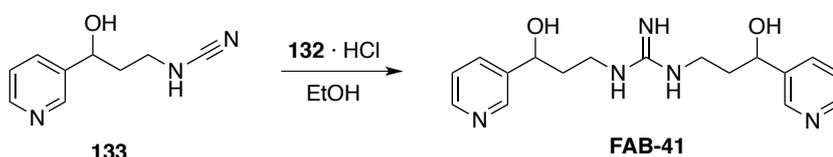
**Esquema 11.** Posible mecanismo de reacción para la formación de **FAB-39**.

En el siguiente intento para sintetizar la guanidina buscada, se cambia la estrategia diametralmente, utilizando un medio ácido que permite la formación del hidrocloreto de **132**. En este caso, el disolvente utilizado fue DMF y como resultado se obtuvo **FAB-40**. La explicación de la procedencia del átomo central puede deberse a restos de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> procedentes de la purificación de los productos de partida, ya que en bibliografía se ha descrito previamente la preparación de análogos de guanidina por reacción entre derivados de cianamida y cloruro amónico.<sup>172, 173</sup>



**Esquema 12.** Posible mecanismo de reacción para la formación de **FAB-40**.

Finalmente, se encontró el procedimiento adecuado para obtener **FAB-41**, siendo necesaria la utilización de cantidades equimolares de la cianamida **133** y la amina **132**, estando esta última en forma de hidrocloreuro antes de comenzar la reacción, y utilizando como disolvente EtOH absoluto.<sup>174</sup>



**Esquema 13.** Síntesis satisfactoria de **FAB-41**.

#### 4.6.3. Análisis espectroscópico

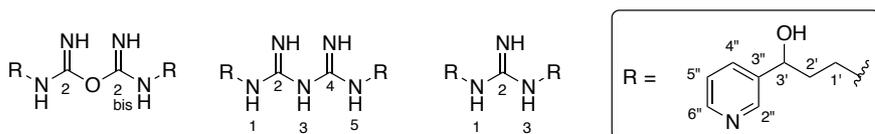
Los disolventes utilizados fueron el metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y el dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

La numeración de las estructuras de estos compuestos sigue las reglas establecidas por la IUPAC, comenzando por la función central de cada compuesto. A partir de este punto, y debido al eje de simetría, ambos lados de la molécula reciben la misma numeración, en primer lugar la cadena alifática y después el anillo de piridina.

El eje de simetría de estas moléculas convierte las señales de ambos lados en idénticas.

Comenzaremos por el estudio de las señales de  $^1\text{H-RMN}$  (Tabla 25).

**Tabla 25.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz) de  $^1\text{H}$ -RMN para los productos finales **FAB-39** – **FAB-41**.



	<b>FAB-39</b>	<b>FAB-40</b>	<b>FAB-41</b>
H-1' H-1' bis	3.24 (m)	3.14 (m)	3.26 (m)
H-2' H-2' bis	1.90 (m)	2.06 (m)	1.48 (m)
H-3' H-3' bis	4.79 (dd, 7.9, 5.4)	4.94 (dd, 8.6, 4.2)	4.76 (dd, 8.9, 4.5)
H-2'' H-2'' bis	8.55 (s)	8.60 (s)	8.60 (d, 1.5)
H-4'' H-4'' bis	7.87 (d, 7.9)	7.91 (d, 7.8)	7.84 (dt, 7.9, 1.5)
H-5'' H-5'' bis	7.43 (dd, 7.9, 4.9)	7.48 (dd, 7.8, 4.9)	7.41 (dd, 7.9, 4.9)
H-6'' H-6'' bis	8.44 (d, 4.9)	8.49 (d, 4.9)	8.48 (dd, 4.9, 1.5)
-OH -OH bis	-	-	5.68 (s)
-NH-1 -NH-3	-	-	7.76 (t, 5.2)
=NH	-	-	7.49 (s)

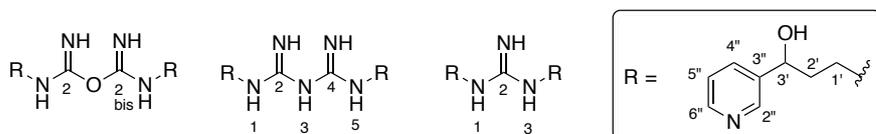
En las cadenas alifáticas los protones de la posición H-1' aparecen como multipletes a  $\delta = 3.26 - 3.14$  ppm, al igual que en la posición H-2', algo más apantallados, con  $\delta = 2.06 - 1.48$  ppm. Por último, la posición H-3' aparece como doble doblete entre  $\delta = 4.94 - 4.76$  ppm ( $J = 8.9 - 7.9$  Hz y  $5.4 - 4.2$  Hz).

En los anillos de piridina, las señales aparecen en el siguiente orden: en primer lugar, H-2'' entre  $\delta = 8.60 - 8.55$  ppm como singlete en **FAB-39** y **FAB-40**, y como doblete en **FAB-41** por acoplarse con H-4'' ( $J = 1.5$  Hz), a continuación, H-6'' a  $\delta = 8.49 - 8.44$  ppm un doblete en **FAB-39** y **FAB-40** por acoplarse con H-5'' ( $J = 4.9$  Hz), y un doble doblete en **FAB-41** por acoplarse con H-5'' ( $J = 4.9$  Hz) y H-4'' ( $J = 1.5$  Hz). La tercera señal del anillo se corresponde con H-4'' a  $\delta = 7.91 - 7.84$  ppm, siendo un doblete en **FAB-**

**39** y **FAB-40** por acoplarse con H-5'' ( $J = 7.9 - 7.8$  Hz), y un doble triplete en **FAB-41** por acoplarse con H-5'' ( $J = 7.9$  Hz) y con H-2'' y H-6'' ( $J = 1.5$  Hz). Por último, H-5'' es en todos los casos el doble doblete más apantallado, con  $\delta = 7.48 - 7.41$  ppm y constantes de acoplamiento  $J = 7.9 - 7.8$  Hz con H-4'' y  $J = 4.9$  Hz con H-6''.

En el espectro de **FAB-41**, al haberse realizado en DMSO- $d_6$ , los protones lábiles sí aparecen. Un triplete a  $\delta = 7.76$  ppm se corresponde con H-1 y H-3 ( $J = 5.2$ ), un singlete a  $\delta = 7.49$  ppm sería el protón del único NH con un doble enlace y a  $\delta = 5.68$  ppm encontramos los protones de los grupos hidroxilo en forma de singlete.

**Tabla 30.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) de  $^{13}\text{C}$ -RMN para los productos finales **FAB-35** – **FAB-38**.



	<b>FAB-39</b>	<b>FAB-40</b>	<b>FAB-41</b>
C-2 bis	162.40	-	-
C-2		170.17	156.00
C-4	-		-
C-1', C-1' bis	40.39	38.69	38.23
C-2', C-2' bis	37.95	36.96	37.82
C-3', C-3' bis	70.29	70.85	67.49
C-2'', C-2'' bis	148.08	147.93	146.78
C-3'', C-3'' bis	142.66	142.02	141.15
C-4'', C-4'' bis	135.83	135.70	134.29
C-5'', C-5'' bis	125.15	125.27	123.68
C-6'', C-6'' bis	148.85	149.29	147.52

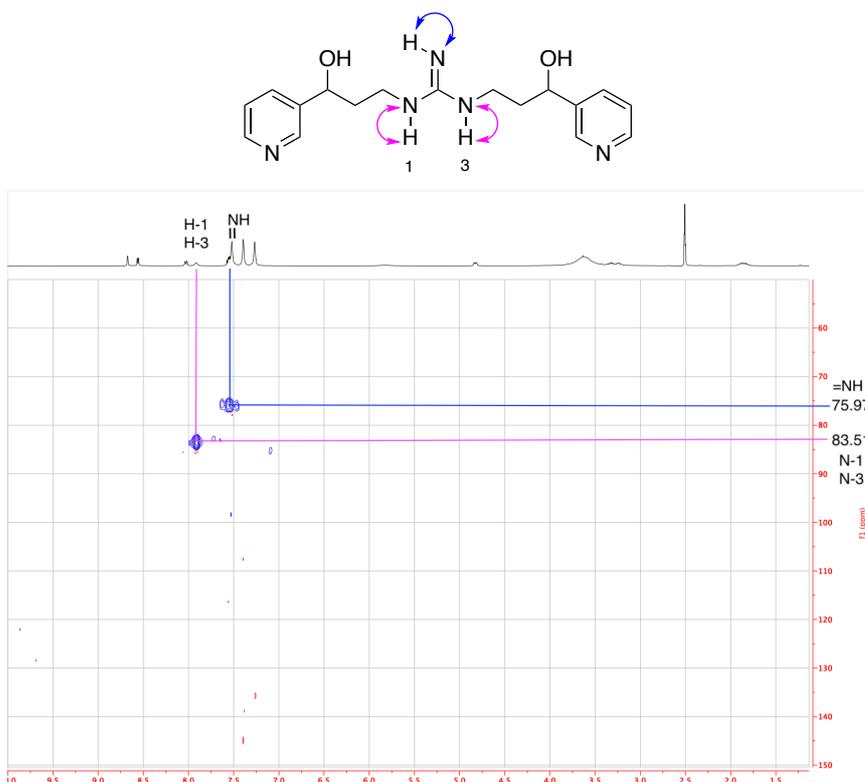
Las señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN son bastante homogéneas a lo largo de la estructura, a excepción de los carbonos en la función principal:

El bis-imidocarbamato de **FAB-39** presenta una señal a  $\delta = 162.40$  ppm correspondiente con C-2 y C-2 bis, la biguanidina de **FAB-40** presenta los carbonos C-2 y C-4 a  $\delta = 170.17$  ppm y el carbono C-2 de **FAB-41** en la función guanidina aparece a  $\delta = 156.00$  ppm.

En la cadena alifática, los carbonos C-1' y C-1' bis se encuentran entre  $\delta = 40.39 - 38.23$  ppm, C-2' y C-2' bis entre  $\delta = 37.95 - 36.96$  ppm, y C-3' y C-3' bis entre  $\delta = 70.85 - 67.49$  ppm.

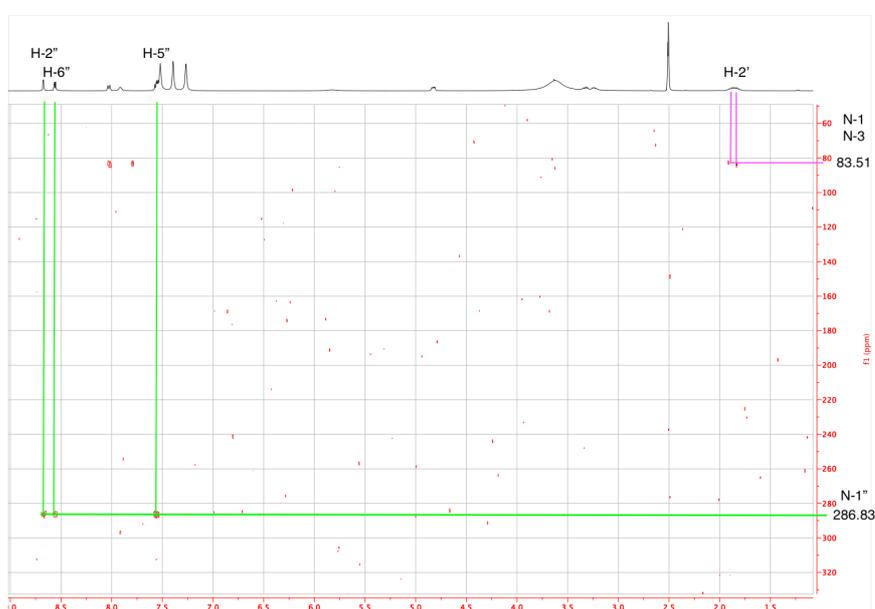
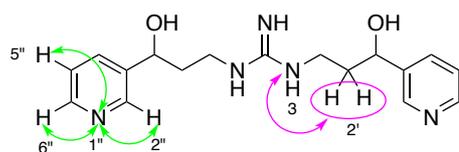
Los anillos de piridina mantienen desplazamientos químicos similares a los de la familia **D**. Los carbonos situados a ambos lados del nitrógeno C-2'' y C-6'' aparecen en el intervalo  $\delta = 149.29 - 146.78$  ppm siendo de difícil distinguirlos entre ellos. Los carbonos cuaternarios C-3'' están localizados entre  $\delta = 142.66 - 141.15$  ppm. Las señales correspondientes a C-4'' son  $\delta = 135.83 - 134.29$  ppm y para C-5'' son  $\delta = 125.27 - 123.68$  ppm.

Para completar la información espectroscópica de estos compuestos se realizaron correlaciones HSQC y HMBC de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  en **FAB-41**.



**Figura 56.** Correlaciones HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de **FAB-41**, resaltando N-1 y N-3 (rosa) y =NH (azul).

Del experimento HSQC (Figura 56) podemos obtener los desplazamientos de los nitrógenos de la función guanidina: N-1 y N-3 aparecen a  $\delta = 83.51$  ppm, mientras que el nitrógeno imínico resuena a  $\delta = 75.97$  ppm.



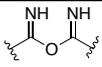
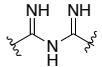
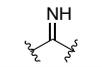
**Figura 57.** Correlaciones HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de **FAB-41** resaltando las interacciones de N-1 y N-3 (rosa) y N-1'' (verde).

A partir del experimento de HMBC (Figura 57) podemos encontrar el nitrógeno de los anillos de piridina a  $\delta = 286.83$  ppm por su correlación con los protones H-2'', H-5'' y H-6''. También puede apreciarse una correlación a larga distancia en los nitrógenos N-1 y N-3 con los protones de las posiciones H-2' y H-2' bis.

#### 4.6.4. Estudios biológicos

En el cribado preliminar de los compuestos de esta familia (Tabla 31), los porcentajes de inhibición a 1 mM sobre las isoformas neuronal e inducible de la NOS, mostraron una mayor selectividad hacia iNOS con valores que oscilan entre el 65.48 % y el 93.93 %, frente a los de nNOS comprendidos entre 7.87 % y 69.29 %.

**Tabla 31.** Porcentajes de inhibición a concentración 1 mM de la familia F.

Compuesto	X	% inhibición iNOS	% inhibición nNOS
<b>FAB-39</b>		88.43 ± 1.53	21.65 ± 0.55
<b>FAB-40</b>		65.48 ± 2.30	7.87 ± 2.59
<b>FAB-41</b>		93.93 ± 0.15	69.29 ± 0.55

## 5. Conclusions



The research carried out in this thesis tries to collaborate in the treatment of several diseases where the NO overproduction is involved.

By studying the NOS selective inhibition in neuronal and inducible isoforms over the endothelial one, potential lead drugs could be developed for those diseases, which, hopefully, would avoid undesirable cardiovascular side effects.

Upon completing the objectives proposed in this thesis, we came to the following conclusions:

- I. Forty-one novel compounds have been designed, synthesized and characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry. They can be divided in six different families (A-F) based on their chemical structure.
- II. A new synthetic pathway for 2-substitued-4-(pyridin-3-yl)pyrimidines has been discovered.
- III. A new route for dimeric derivatives from previous inhibitors has been implemented, by creating a guanidine-like bridges.
- IV. All the synthesized final products were tested *in vitro* as NOS inhibitors in both, inducible and neuronal isoforms. The results have shown:
  - a. A general preference for iNOS inhibition, excluding **B** family, where prevailed the selectivity towards nNOS.
  - b. **C** and **D** families included the inhibitors with the highest selectivity and potency, being **FAB-30**, **FAB-17** and **FAB-15** those which rose among the rest.
  - c. The IC<sub>50</sub> of these derivatives were 4.6 μM, 20.0 μM and 22.5 μM, respectively, the lowest ones ever registered in our research group.

- V. The most interesting inhibitors, were subjected to additional eNOS essays, showing absence of cardiovascular effects at concentrations were the other isoforms were inhibited.
- VI. The structure-activity relationship of each family could be summarized:
- a. Compounds from **A** have better iNOS inhibition values when  $R_2$  is a bulky substituent.
  - b. In **B**, the aromatic ring with only the amine moiety in position 2' results in the highest nNOS inhibition.
  - c.  $R_1$  substituents in **C**, tend to create better iNOS inhibitors, specially when they are electron donors like methoxy groups.
  - d. The pyridine ring in **D** seems to have an important role in the activity as iNOS inhibitor, nevertheless further analysis with more derivatives will be necessary to unveil it.
  - e. Dimers from **F**, trigger a high inhibition rate at the same time that decreases the selectivity between iNOS and nNOS.
- VII. The results obtained in this thesis encourage us to continue in the search of powerful and selective NOS inhibitors, since their finding may represent a step forward in the development of future therapies for neurodegenerative diseases.

## 6. Bibliografía



1. Furchgott RF. A research trail over half a century. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995; 35 : 1-27. doi:10.1146/annurev.pharmtox.35.1.1
2. Mónica FZ, Bian K, Murad F. The Endothelium-Dependent Nitric Oxide–cGMP Pathway. In: *Advances in Pharmacology.* Vol 77. ; 2016:1-27. doi:10.1016/bs.apha.2016.05.001
3. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84 (24): 9265-9269. doi:10.1073/pnas.84.24.9265
4. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87 (2): 682-685. doi:10.1073/pnas.87.2.682
5. The Nobel Prize Organization. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/summary/>. Published 1998. Accessed January 14, 2020.
6. De Berrazueta JR. El nobel para el óxido nítrico. la injusta exclusión del Dr. Salvador moncada. *Rev Esp Cardiol.* 1999; 52 (4): 221-226. doi:10.1016/S0300-8932(99)74902-X
7. U.S. National Library of Medicine. Nitric oxide publications through history. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=nitric+oxide&filter=years.1986-2020&timeline=expanded&sort=pubdate&sort\\_order=asc&size=10](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=nitric+oxide&filter=years.1986-2020&timeline=expanded&sort=pubdate&sort_order=asc&size=10). Published 2020. Accessed January 20, 2020.
8. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2010; 23 (3): 153-165. doi:10.1016/j.niox.2010.06.001
9. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev.* 1998; 17 (1): 7-23. doi:10.1023/A:1005940202801
10. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2009; 20 (4): 223-230.

doi:10.1016/j.niox.2009.03.001

11. Rafikov R, Fonseca F V., Kumar S, et al. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol.* 2011; 210 (3): 271-284. doi:10.1530/JOE-11-0083
12. Conti A, Miscusi M, Cardali S, et al. Nitric oxide in the injured spinal cord: Synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. *Brain Res Rev.* 2007; 54 (1): 205-218. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.01.013
13. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* 2020; 40 (1): 158-189. doi:10.1002/med.21599
14. Lacza Z, Pankotai E, Csordás A, et al. Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: Does mtNOS exist? *Nitric Oxide.* 2006; 14 (2): 162-168. doi:10.1016/j.niox.2005.05.011
15. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357 (3): 593-615. doi:10.1042/0264-6021:3570593
16. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: Controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2003; 285 (2 54-2): 178-190. doi:10.1152/ajprenal.00048.2003
17. Newton DC, Montgomery HJ, Guy Guillemette J. The Reductase Domain of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Is Fully Active in the Absence of Bound Calmodulin. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 359 (2): 249-257. doi:10.1006/abbi.1998.0917
18. Westerlund AM, Delemotte L. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the promiscuous target-protein binding of calmodulin. *PLoS Comput Biol.* 2018; 14 (4): 1-27. doi:10.1371/journal.pcbi.1006072
19. Curtin A, Kinsella G, Stephens J. Computational Development of Selective nNOS Inhibitors: Binding Modes and Pharmacokinetic Considerations. *Curr Med Chem.* 2015; 22 (21): 2558-2579. doi:10.2174/0929867322666150429112600

20. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation*. 2006; 113 (13): 1708-1714. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532
21. Ghasemi M, Mayasi Y, Hannoun A, Eslami SM, Carandang R. Nitric Oxide and Mitochondrial Function in Neurological Diseases. *Neuroscience*. 2018; 376 : 48-71. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.02.017
22. Thomas DD, Espey MG, Ridnour LA, et al. Hypoxic inducible factor 1 $\alpha$ , extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101 (24): 8894-8899. doi:10.1073/pnas.0400453101
23. Guner YS, Ochoa CJ, Wang J, et al. Peroxynitrite-induced p38 MAPK pro-apoptotic signaling in enterocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 384 (2): 221-225. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.091
24. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, et al. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45 (1): 18-31. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020
25. Paolillo M, Peters S, Schramm A, Schlossmann J, Feil R. Real-time imaging reveals augmentation of glutamate-induced ca<sup>2+</sup> transients by the NO-cGMP pathway in cerebellar granule neurons. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (8): 2185. doi:10.3390/ijms19082185
26. Vega Rasgado LA, Reyes GC, Vega Díaz F. Role of nitric oxide synthase on brain GABA transaminase activity and GABA levels. *Acta Pharm*. 2018; 68 (3): 349-359. doi:10.2478/acph-2018-0022
27. Džoljić E, Grabatinić I, Kostić V. Why is nitric oxide important for our brain? *Funct Neurol*. 2015; 30 (3): 159-163. doi:10.11138/fneur/2015.30.3.159
28. Hanson QM, Carley JR, Gilbreath TJ, Smith BC, Underbakke ES. Calmodulin-induced Conformational Control and Allosteric Underlying Neuronal Nitric Oxide Synthase Activation. *J Mol Biol*. 2018; 430 (7): 935-947. doi:10.1016/j.jmb.2018.02.003
29. Sharma NM, Liu X, Llewellyn TL, Katsurada K, Patel KP. Exercise training augments neuronal nitric oxide synthase dimerization in the paraventricular nucleus of rats with chronic heart failure. *Nitric*

- Oxide - Biol Chem.* 2019; 87 : 73-82. doi:10.1016/j.niox.2019.03.005
30. Natarajan M, Konopinski R, Krishnan M, et al. Inhibitor- $\kappa$ B kinase attenuates HSP90-Dependent endothelial nitric oxide synthase function in vascular endothelial cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2015; 308 (8): 673-683. doi:10.1152/ajpcell.00367.2014
  31. Peng HM, Morishima Y, Pratt WB, Osawa Y. Modulation of heme/substrate binding cleft of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) regulates binding of Hsp90 and Hsp70 proteins and nNOS ubiquitination. *J Biol Chem.* 2012; 287 (2): 1556-1565. doi:10.1074/jbc.M111.323295
  32. Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9 : 322. doi:10.3389/fncel.2015.00322
  33. McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. Presence of Reactive Microglia in Monkey Substantia Nigra Years after 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Administration. *Ann Neurol.* 2003; 54 (5): 599-604. doi:10.1002/ana.10728
  34. Chang YC, Kim HW, Rapoport SI, Rao JS. Chronic NMDA administration increases neuroinflammatory markers in rat frontal cortex: Cross-talk between excitotoxicity and neuroinflammation. *Neurochem Res.* 2008; 33 (11): 2318-2323. doi:10.1007/s11064-008-9731-8
  35. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018; 25 (1): 59-70. doi:10.1111/ene.13439
  36. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol.* 2014; 88 (4): 640-651. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.024
  37. Alzheimer's Association. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2019; 15 (3): 321-387. doi:10.1016/j.jalz.2019.01.010
  38. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011; 377 (9770): 1019-1031. doi:10.1016/S0140-6736(10)61349-9

39. World Health Organization. Dementia fact sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Published 2019. Accessed December 27, 2019.
40. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*. 2017; 32 (8): 523-532. doi:10.1016/j.nrl.2016.02.016
41. Tyas S. Are tobacco and alcohol use related to Alzheimer's disease? A critical assessment of the evidence and its implications. *Addict Biol*. 1996; 1 (3): 237-254. doi:10.1080/1355621961000124856
42. Cataldo JK, Prochaska JJ, Glantz SA. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. *J Alzheimer's Dis*. 2010; 19 (2): 465-480. doi:10.3233/JAD-2010-1240
43. Hebert LE, Scherr PA, Beckett LA, et al. Relation of Smoking and Alcohol Consumption to Incident Alzheimer's Disease. *Am J Epidemiol*. 1992; 135 (4): 347-355. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116296
44. Tyas SL. Alcohol use and the risk of developing Alzheimer's disease. *Alcohol Res Health*. 2001; 25 (4): 299-306. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910708>.
45. Franz G, Beer R, Kampfl A, et al. Amyloid beta 1-42 and tau in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *Neurology*. 2003; 60 (9): 1457 LP - 1461. doi:10.1212/01.WNL.0000063313.57292.00
46. Balez R, Ooi L. Getting to NO Alzheimer's disease: Neuroprotection versus neurotoxicity mediated by nitric oxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016 . doi:10.1155/2016/3806157
47. Hannibal L. Nitric Oxide Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Curr Alzheimer Res*. 2015; 13 (2): 135-149. doi:10.2174/1567205012666150921101250
48. Takahashi M, Chin Y, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, Arai T. Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 2012; 510 (1): 48-52.

doi:10.1016/j.neulet.2011.12.067

49. Kalia L V., Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015; 386 (9996): 896-912. doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3
50. Dorsey ER, Bloem BR. The Parkinson pandemic - A call to action. *JAMA Neurol*. 2018; 75 (1): 9-10. doi:10.1001/jamaneurol.2017.3299
51. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 2007; 68 (5): 384-386. doi:10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03
52. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*. 2014; 29 (13): 1583-1590. doi:10.1002/mds.25945
53. Singh S, Kumar S, Dikshit M. Involvement of the mitochondrial apoptotic pathway and nitric oxide synthase in dopaminergic neuronal death induced by 6-hydroxydopamine and lipopolysaccharide. *Redox Rep*. 2010; 15 (3): 115-122. doi:10.1179/174329210X12650506623447
54. Gatto EM, Riobó NA, Carreras MC, et al. Overexpression of Neutrophil Neuronal Nitric Oxide Synthase in Parkinson's Disease. *Nitric Oxide*. 2000; 4 (5): 534-539. doi:10.1006/niox.2000.0288
55. Guix FX, Uribealago I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol*. 2005; 76 (2): 126-152. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.06.001
56. H. Wilms, L. Zecca, P. Rosenstiel, J. Sievers, G. Deuschl, R. Lucius. Inflammation in Parkinson's Diseases and Other Neurodegenerative Diseases: Cause and Therapeutic Implications. *Curr Pharm Des*. 2007; 13 (18): 1925-1928. doi:10.2174/138161207780858429
57. da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, et al. Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol*. 2009; 11 (11): 1370-1375. doi:10.1038/ncb1981
58. Daiber A, Xia N, Steven S, et al. New therapeutic implications of

- endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function/dysfunction in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (1): 187. doi:10.3390/ijms20010187
59. Da Silva RF, Trapé ATA, Reia TA, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase (enos) gene polymorphisms and physical fitness levels with plasma nitrite concentrations and arterial blood pressure values in older adults. *PLoS One.* 2018; 13 (10). doi:10.1371/journal.pone.0206254
  60. García-Ortiz A, Serrador JM. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends Mol Med.* 2018; 24 (4): 412-427. doi:10.1016/j.molmed.2018.02.002
  61. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* 1998; 113 (2): 147-156. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00648.x
  62. Mukherjee P, Cinelli MA, Kang S, Silverman RB. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chem Soc Rev.* 2014; 43 (19): 6814-6838. doi:10.1039/c3cs60467e
  63. Minhas R, Bansal Y, Bansal G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. *Med Res Rev.* 2019;(March): 1-33. doi:10.1002/med.21636
  64. Marietta MA. Perspective: Approaches toward Selective Inhibition of Nitric Oxide Synthase. *J Med Chem.* 1994; 37 (13): 1899-1907. doi:10.1021/jm00039a001
  65. S. Furfine E, F. Harmon M, E. Paith J, P. Garvey E. Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-NG-nitroarginine. *Biochemistry.* 2002; 32 (33): 8512-8517. doi:10.1021/bi00084a017
  66. Kobayashi Y, Ikeda K, Shinozuka K, Nara Y, Yamori Y, Hattori K. L-nitroarginine increases blood pressure in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1991; 18 (6): 397-399. doi:10.1111/j.1440-1681.1991.tb01470.x
  67. Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol.* 1987; 138 (2): 550

LP - 565. <http://www.jimmunol.org/content/138/2/550.abstract>.

68. Maurer TS, Mishra Y, Fung H-L. Nonlinear pharmacokinetics of L-NG-methyl-arginine: Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges.pdf in rats: characterization by an improved HP. *Biopharm Drug Dispos.* 1999; 20 (8): 397-400. doi:10.1002/1099-081X(199911)20:8<397::AID-BDD196>3.0.CO;2-M
69. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, et al. Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia.* 1998; 18 (1): 27-32. doi:10.1046/j.1468-2982.1998.1801027.x
70. Q. Zhang H, Fast W, A. Marletta M, Martasek P, B. Silverman R. Potent and Selective Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase by N $\omega$ -Propyl-L-arginine. *J Med Chem.* 1997; 40 (24): 3869-3870. doi:10.1021/jm970550g
71. Ijuin R, Umezawa N, Nagai SI, Higuchi T. Evaluation of 3-substituted arginine analogs as selective inhibitors of human nitric oxide synthase isozymes. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2005; 15 (11): 2881-2885. doi:10.1016/j.bmcl.2005.03.078
72. Lalatsa A, Butt AM. Physiology of the Blood–Brain Barrier and Mechanisms of Transport Across the BBB. In: *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors.* Academic Press; 2018:49-74. doi:10.1016/b978-0-12-812218-1.00003-8
73. Park J-M, Higuchi T, Kikuchi K, et al. Selective inhibition of human inducible nitric oxide synthase by S-alkyl-L-isothiocitrulline-containing dipeptides. *Br J Pharmacol.* 2001; 132 (8): 1876-1882. doi:10.1038/sj.bjp.0704023
74. Silverman RB, Huang H, Marletta MA, Martasek P. Selective Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase by N $\omega$ -Nitroarginine- and Phenylalanine-Containing Dipeptides and Dipeptide Esters. *J Med Chem.* 1997; 40 (18): 2813-2817. doi:10.1021/jm970200u
75. Huang H, Martasek P, Roman LJ, Masters BSS, Silverman RB. N $\omega$ -Nitroarginine-Containing Dipeptide Amides. Potent and Highly Selective Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *J Med Chem.* 1999; 42 (16): 3147-3153. doi:10.1021/jm990111c

76. F. Veber D, R. Johnson S, Cheng H-Y, R. Smith B, W. Ward K, D. Kopple K. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem.* 2002; 45 (12): 2615-2623. doi:10.1021/jm020017n
77. Erdal EP, Martásek P, Roman LJ, Silverman RB. Hydroxyethylene isosteres of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorganic Med Chem.* 2007; 15 (18): 6096-6108. doi:10.1016/j.bmc.2007.06.038
78. Flinspach ML, Li H, Jamal J, et al. Structural basis for dipeptide amide isoform-selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11 (1): 54-59. doi:10.1038/nsmb704
79. Ji H, Tan S, Igarashi J, et al. Selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors and the prevention of cerebral palsy. *Ann Neurol.* 2009; 65 (2): 209-217. doi:10.1002/ana.21555
80. B. Silverman R. Design of Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors for the Prevention and Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Acc Chem Res.* 2009; 42 (3): 439-451. doi:10.1021/ar800201v
81. Garcin ED, Arvai AS, Rosenfeld RJ, et al. Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase. *Nat Chem Biol.* 2008; 4 : 700. doi:10.1038/nchembio.115
82. Hah J-M, Martásek P, J. Roman L, B. Silverman R. Aromatic Reduced Amide Bond Peptidomimetics as Selective Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *J Med Chem.* 2003; 46 (9): 1661-1669. doi:10.1021/jm0202932
83. Kang S, Li H, Tang W, et al. 2-Aminopyridines with a Truncated Side Chain to Improve Human Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitory Potency and Selectivity. *J Med Chem.* 2015; 58 (14): 5548-5560. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00573
84. Camacho ME, Chayah M, García ME, et al. Quinazolinones, Quinazolinthiones, and Quinazolinimines as Nitric Oxide Synthase Inhibitors: Synthetic Study and Biological Evaluation. *Arch Pharm (Weinheim).* 2016: 638-650. doi:10.1002/ardp.201600020

85. Xue F, Fang J, Lewis WW, Martásek P, Roman LJ, Silverman RB. Potent and selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors with improved cellular permeability. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20 (2): 554-557. doi:10.1016/j.bmcl.2009.11.086
86. Poulos TL, Li H. Nitric oxide synthase and structure-based inhibitor design. *Nitric Oxide*. 2017; 63 : 68-77. doi:10.1016/j.niox.2016.11.004
87. Begley DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther*. 2004; 104 (1): 29-45. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2004.08.001
88. Ji H, Li H, Martásek P, Roman LJ, Poulos TL, Silverman RB. Discovery of highly potent and selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase by fragment hopping. *J Med Chem*. 2009; 52 (3): 779-797. doi:10.1021/jm801220a
89. Xue F, Li H, Delker SL, et al. Potent, highly selective, and orally bioavailable gem-difluorinated monocationic inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *J Am Chem Soc*. 2010; 132 (40): 14229-14238. doi:10.1021/ja106175q
90. Huang H, Ji H, Li H, et al. Selective monocationic inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. Binding mode insights from molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc*. 2012; 134 (28): 11559-11572. doi:10.1021/ja302269r
91. Xue F, Fang J, L. Delker S, et al. Symmetric Double-Headed Aminopyridines, a Novel Strategy for Potent and Membrane-Permeable Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *J Med Chem*. 2011; 54 (7): 2039-2048. doi:10.1021/jm101071n
92. Jing Q, Li H, Roman LJ, Martásek P, Poulos TL, Silverman RB. Accessible chiral linker to enhance potency and selectivity of neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2014; 5 (1): 56-60. doi:10.1021/ml400381s
93. Lowe JA, Qian W, Volkmann RA, et al. A new class of selective and potent inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999; 9 (17): 2569-2572. doi:10.1016/S0960-894X(99)00432-1

94. A. Lowe J, Qian W, E. Drozda S, et al. Structure–Activity Relationships of Potent, Selective Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase Based on the 6-Phenyl-2-aminopyridine Structure. *J Med Chem.* 2004; 47 (6): 1575-1586. doi:10.1021/jm030519g
95. Nason DM, Heck SD, Bodenstern MS, et al. Substituted 6-phenylpyridin-2-ylamines: selective and potent inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004; 14 (17): 4511-4514. doi:10.1016/j.bmcl.2004.06.043
96. Reif DW, McCarthy DJ, Cregan E, Macdonald JE. Discovery and development of neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28 (10): 1470-1477. doi:10.1016/S0891-5849(00)00250-1
97. Zhang ZG, Reif D, Macdonald J, et al. ARL 17477, a Potent and Selective Neuronal NOS Inhibitor Decreases Infarct Volume after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16 (4): 599-604. doi:10.1097/00004647-199607000-00009
98. Tseng EE, Brock M V, Lange MS, et al. Nitric oxide mediates neurologic injury after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1999; 67 (1): 65-71. doi:10.1016/S0003-4975(98)01363-0
99. Fedorov R, Vasan R, Ghosh DK, Schlichting I. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *PNAS.* 2004; 84 (24): 9265-9269. doi:10.1073/pnas.84.24.9265
100. Liang G, Neuenschwander K, Chen X, et al. Structure-based design, synthesis, and profiling of potent and selective neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitors with an amidinothiophene hydroxypiperidine scaffold. *Medchemcomm.* 2011; 2 (3): 201-205. doi:10.1039/c0md00255k
101. Ramnauth J, Speed J, P. Maddaford S, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 3,4-Dihydroquinolin-2(1H)-one and 1,2,3,4-Tetrahydroquinoline-Based Selective Human Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) Inhibitors. *J Med Chem.* 2011; 54 (15): 5562-5575. doi:10.1021/jm200648s
102. Ramnauth J, Renton P, Dove P, et al. 1,2,3,4-tetrahydroquinoline-

- based selective human neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitors: Lead optimization studies resulting in the identification of N-(1-(2-(methylamino)ethyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl) thiophene-2-carboximidamide as a . *J Med Chem.* 2012; 55 (6): 2882-2893. doi:10.1021/jm3000449
103. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature.* 2006; 440 (7083): 463-469. doi:10.1038/nature04710
  104. Huang H, Li H, Yang S, et al. Potent and Selective Double-Headed Thiophene-2-carboximidamide Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase for the Treatment of Melanoma. *J Med Chem.* 2014; 57 (3): 686-700. doi:10.1021/jm401252e
  105. Li H, J. Evenson R, Chreifi G, B. Silverman R, L. Poulos T. Structural Basis for Isoform Selective Nitric Oxide Synthase Inhibition by Thiophene-2-carboximidamides. *Biochemistry.* 2018; 57 (44): 6319-6325. doi:10.1021/acs.biochem.8b00895
  106. Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272 (8): 4959-4963. doi:10.1074/jbc.272.8.4959
  107. Wolff DJ, Datto GA, Samatovicz RA, Tempsick RA. Calmodulin-dependent nitric-oxide synthase. Mechanism of inhibition by imidazole and phenylimidazoles. *J Biol Chem.* 1993; 268 (13): 9425-9429.
  108. Ulhaq S, Chinje EC, Naylor MA, Jaffar M, Stratford IJ, Threadgill MD. S-2-Amino-5-azolylpentanoic Acids Related to L-Ornithine as inhibitors of the isoforms of nitric oxide synthase (NOS). *Bioorg Med Chem.* 1998; 6 (11): 2139-2149. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089698001746>.
  109. D. Martell J, Li H, Doukov T, et al. Heme-Coordinating Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. Iron-Thioether Coordination Is Stabilized by Hydrophobic Contacts without Increased Inhibitor Potency. *J Am Chem Soc.* 2009; 132 (2): 798-806. doi:10.1021/ja908544f

110. Bland-Ward PA, Moore PK. 7-Nitro indazole Derivatives are potent inhibitors of brain, endothelium and inducible isoforms of nitric oxide synthase. *Life Sci.* 1995; 57 (11): 131-135. doi:10.1016/0024-3205(95)02046-L
111. Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, Babbedge RC. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol.* 1993; 110 (1): 219-224. doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13795.x
112. Handy RLC, Moore PK. Mechanism of the inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM). *Life Sci.* 1997; 60 (25): PL389-PL394. doi:10.1016/S0024-3205(97)00295-6
113. Palumbo A, Astarita G, D'Ischia M. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 6-nitrocatecholamines, putative reaction products of nitric oxide with catecholamines under oxidative stress conditions. *Biochem J.* 2001; 356 (1): 105 LP - 110. doi:10.1042/bj3560105
114. L. Delker S, Xue F, Li H, Jamal J, B. Silverman R, L. Poulos T. Role of Zinc in Isoform-Selective Inhibitor Binding to Neuronal Nitric Oxide Synthase,. *Biochemistry.* 2010; 49 (51): 10803-10810. doi:10.1021/bi1013479
115. G. Fröhlich L, Kotsonis P, Traub H, et al. Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase by 4-Amino Pteridine Derivatives: Structure–Activity Relationship of Antagonists of (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin Cofactor. *J Med Chem.* 1999; 42 (20): 4108-4121. doi:10.1021/jm981129a
116. Matter H, Kotsonis P, Klingler O, et al. Structural Requirements for Inhibition of the Neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS-I): 3D-QSAR Analysis of 4-Oxo- and 4-Amino-Pteridine-Based Inhibitors. *J Med Chem.* 2002; 45 (14): 2923-2941. doi:10.1021/jm020074g
117. Wolff DJ, Gribin BJ. The Inhibition of the Constitutive and Inducible Nitric-Oxide Synthase Isoforms by Indazole Agents. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 311 (2): 300-306. doi:10.1006/abbi.1994.1241
118. Sato T, Morishima Y, Sugimura M, Uchida T, Shirasaki Y. DY-9760e,

- a novel calmodulin antagonist, reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 1999; 370 (2): 117-123. doi:10.1016/S0014-2999(99)00133-8
119. Hashiguchi A, Yano S, Morioka M, et al. The Post-ischemic Administration of 3-[2-[4-(3-Chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxy-1-(4-imidazolylmethyl)-1H-indazole Dihydrochloride 3.5 Hydrate (DY-9760e), a Novel Calmodulin Antagonist, Prevents Delayed Neuronal Death in Gerbil Hi. *J Pharmacol Sci.* 2004; 96 (1): 65-72. doi:10.1254/jphs.FP0040348
  120. Feldman PL, Griffith OW, Hong H, Stuehr DJ. Irreversible Inactivation of Macrophage and Brain Nitric Oxide Synthase by L-NG-Methylarginine Requires NADPH-Dependent Hydroxylation. *J Med Chem.* 1993; 36 (4): 491-496. doi:10.1021/jm00056a009
  121. Vuletich JL, Lowe ER, Jianmongkol S, et al. Alteration of the heme prosthetic group of neuronal nitric-oxide synthase during inactivation by Ng-amino-L-arginine in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol.* 2002; 62 (1): 110-118. doi:10.1124/mol.62.1.110
  122. Wolff DJ, Gauld DS, Neulander MJ, Southan G. Inactivation of nitric oxide synthase by substituted aminoguanidines and aminoisothioureas. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283 (1): 265-273.
  123. Babu BR, Griffith OW. N5-(1-imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1998; 273 (15): 8882-8889. doi:10.1074/jbc.273.15.8882
  124. Zhang HQ, Dixon RP, Marletta MA, Nikolic D, Van Breemen R, Silverman RB. Mechanism of inactivation of neuronal nitric oxide synthase by N( $\omega$ )-allyl-L-arginine. *J Am Chem Soc.* 1997; 119 (45): 10888-10902. doi:10.1021/ja964160f
  125. J. Wolff D, Mialkowski K, F. Richardson C, R. Wilson S. C60-Fullerene Monomalonate Adducts Selectively Inactivate Neuronal Nitric Oxide Synthase by Uncoupling the Formation of Reactive Oxygen Intermediates from Nitric Oxide Production. *Biochemistry.* 2000; 40 (1): 37-45. doi:10.1021/bi0019444
  126. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key

- Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2019; 24 (8): 1583. doi:10.3390/molecules24081583
127. Chabrier PE, Auguet M, Spinnewyn B, et al. BN 80933, a dual inhibitor of neuronal nitric oxide synthase and lipid peroxidation: A promising neuroprotective strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 (19): 10824-10829. doi:10.1073/pnas.96.19.10824
  128. Auvin S, Auguet M, Navet E, et al. Novel inhibitors of neuronal nitric oxide synthase with potent antioxidant properties. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003; 13 (2): 209-212. doi:10.1016/S0960-894X(02)00883-1
  129. Wang Y, F. Monzingo A, Hu S, H. Schaller T, D. Robertus J, Fast W. Developing Dual and Specific Inhibitors of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase-1 and Nitric Oxide Synthase: Toward a Targeted Polypharmacology To Control Nitric Oxide. *Biochemistry*. 2009; 48 (36): 8624-8635. doi:10.1021/bi9007098
  130. Ramnauth J, Rakhit S, Maddaford S, Bhardwaj N. Amino benzothiazole compounds with NOS inhibitory activity. 2006: U.S. Patent No. 7,141,595. Washington, DC.
  131. Renton P, Green B, Maddaford S, Rakhit S, S. Andrews J. NOpiates: Novel Dual Action Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors with  $\mu$ -Opioid Agonist Activity. *ACS Med Chem Lett*. 2012; 3 (3): 227-231. doi:10.1021/ml200268w
  132. Quang DN, Hashimoto T, Arakawa Y, et al. Grifolin derivatives from *Albatrellus caeruleoporus*, new inhibitors of nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Bioorg Med Chem*. 2006; 14 (1): 164-168. doi:10.1016/j.bmc.2005.08.005
  133. Kim JY, Lim HJ, Lee DY, et al. In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19 (3): 937-940. doi:10.1016/j.bmcl.2008.11.103
  134. Behery FAA, Naeem ZEM, Maatooq GT, et al. Phenanthrenoids from *Juncus acutus* L., New Natural Lipopolysaccharide-Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *Chem Pharm Bull*. 2007; 55 (8): 1264-1266. doi:10.1248/cpb.55.1264
  135. Han J-M, Song Lee W, Kim J-R, et al. Effect of 5- O-

- Methylhirsutanonol on Nuclear Factor- $\kappa$ B-Dependent Production of NO and Expression of iNOS in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Cells. *J Agric Food Chem*. 2007; 56 (1): 92-98. doi:10.1021/jf0721085
136. Lee K-H, Ab. Aziz FH, Syahida A, et al. Synthesis and biological evaluation of curcumin-like diarylpentanoid analogues for anti-inflammatory, antioxidant and anti-tyrosinase activities. *Eur J Med Chem*. 2009; 44 (8): 3195-3200. doi:10.1016/j.ejmech.2009.03.020
137. Zhong C, Liu X-H, Chang J, Yu J-M, Sun X. Inhibitory effect of resveratrol dimerized derivatives on nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013; 23 (15): 4413-4418. doi:10.1016/j.bmcl.2013.05.058
138. Hwang JS, Lee SA, Hong SS, et al. Inhibitory constituents of *Nardostachys chinensis* on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012; 22 (1): 706-708. doi:10.1016/j.bmcl.2011.10.043
139. Wang L-Y, Unehara T, Kitanaka S. Anti-inflammatory Activity of New Guaiane Type Sesquiterpene from *Wikstroemia indica*. *Chem Pharm Bull*. 2005; 53 (1): 137-139. doi:10.1248/cpb.53.137
140. Liu Y, Ma J, Zhao Q, et al. Guaiane-Type Sesquiterpenes from *Curcuma phaeocaulis* and Their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. *J Nat Prod*. 2013; 76 (6): 1150-1156. doi:10.1021/np400202f
141. Yoon JH, Lim HJ, Lee HJ, Kim H-D, Jeon R, Ryu J-H. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by xanthanolides isolated from *Xanthium strumarium*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18 (6): 2179-2182. doi:10.1016/j.bmcl.2007.12.076
142. Honda T, Finlay HJ, Gribble GW, Suh N, Sporn MB. New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg Med Chem Lett*. 1997; 7 (13): 1623-1628. doi:10.1016/S0960-894X(97)00279-5
143. Park E-J, Sang-Ngern M, Chee Chang L, M. Pezzuto J. Physalactone and 4 $\beta$ -Hydroxywithanolide E Isolated from *Physalis peruviana* Inhibit LPS-Induced Expression of COX-2 and iNOS Accompanied by

- Abatement of Akt and STAT1. *J Nat Prod.* 2019; 82 (3): 492-499.  
doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00861
144. Maccallini C, Montagnani M, Paciotti R, et al. Selective Acetamidine-Based Nitric Oxide Synthase Inhibitors: Synthesis, Docking, and Biological Studies. *Med Chem (Los Angeles)*. 2015; 6 : 635-640. doi:10.1021/acsmedchemlett.5b00149
145. Fantacuzzi M, Maccallini C, Di Matteo M, et al. Screening of NOS activity and selectivity of newly synthesized acetamidines using RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 120 : 419-424. doi:10.1016/j.jpba.2015.11.045
146. Maccallini C, Di Matteo M, Gallorini M, et al. Discovery of N-{3-[(ethanimidoylamino)methyl]benzyl}-L-prolinamide dihydrochloride: A new potent and selective inhibitor of the inducible nitric oxide synthase as a promising agent for the therapy of malignant glioma. *Eur J Med Chem.* 2018; 152 : 53-64. doi:10.1016/j.ejmech.2018.04.027
147. McMillan K, Adler M, Auld DS, et al. Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97 (4): 1506-1511. doi:10.1073/pnas.97.4.1506
148. Davey DD, Adler M, Arnaiz D, et al. Design, synthesis, and activity of 2-imidazol-1-ylpyrimidine derived inducible nitric oxide synthase dimerization inhibitors. *J Med Chem.* 2007; 50 (6): 1146-1157. doi:10.1021/jm061319i
149. Bonnefous C, Payne JE, Roppe J, et al. Discovery of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor development candidate KD7332, part 1: Identification of a novel, potent, and selective series of quinolinone iNOS dimerization inhibitors that are orally active in rodent pain models. *J Med Chem.* 2009; 52 (9): 3047-3062. doi:10.1021/jm900173b
150. Symons KT, Nguyen PM, Massari ME, et al. Pharmacological Characterization of KLYP961, a Dual Inhibitor of Inducible and Neuronal Nitric-Oxide Synthases. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336 (2): 468 LP - 478. doi:10.1124/jpet.110.172817
151. Blanco S, Hernández R, Franchelli G, Ramos-Álvarez MM, Peinado

- MÁ. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. *Nitric Oxide*. 2017; 62 : 32-43. doi:10.1016/j.niox.2016.12.001
152. León J, Vives F, Crespo E, et al. Modification of Nitric Oxide Synthase Activity and Neuronal Response in Rat Striatum by Melatonin and Kynurenine Derivatives. *J Neuroendocrinol*. 1998; 10 (4): 297-302. doi:10.1046/j.1365-2826.1998.00203.x
153. Camacho E, León J, Carrión A, et al. Inhibition of nNOS Activity in Rat Brain by Synthetic Kynurenines: Structure–Activity Dependence. *J Med Chem*. 2001; 45 (2): 263-274. doi:10.1021/jm010916w
154. Entrena A, Encarnación Camacho M, Dora Carrión M, et al. Kynurenamines as Neural Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *J Med Chem*. 2005; 48 (26): 8174-8181. doi:10.1021/jm050740o
155. León J, Escames G, Rodríguez MI, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem*. 2006; 98 (6): 2023-2033. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04029.x
156. Chayah M, Carrión MD, Gallo MA, Jiménez R, Duarte J, Camacho ME. Development of Urea and Thiourea Kynurenamine Derivatives: Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation as Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *ChemMedChem*. 2015; 10 (5): 874-882. doi:10.1002/cmdc.201500007
157. Chayah M, Camacho ME, Carrión MD, Gallo MA, Romero M, Duarte J. N,N'-Disubstituted thiourea and urea derivatives: Design, synthesis, docking studies and biological evaluation against nitric oxide synthase. *Medchemcomm*. 2016; 7 (4): 667-678. doi:10.1039/c5md00477b
158. Carrión MD, Chayah M, Entrena A, et al. Synthesis and biological evaluation of 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives as potential nNOS/iNOS selective inhibitors. Part 2: Influence of diverse substituents in both the phenyl moiety and the acyl group. *Bioorg Med Chem*. 2013; 21 (14): 4132-4142. doi:10.1016/j.bmc.2013.05.016
159. López Cara LC, Camacho ME, Carrión MD, et al. Phenylpyrrole

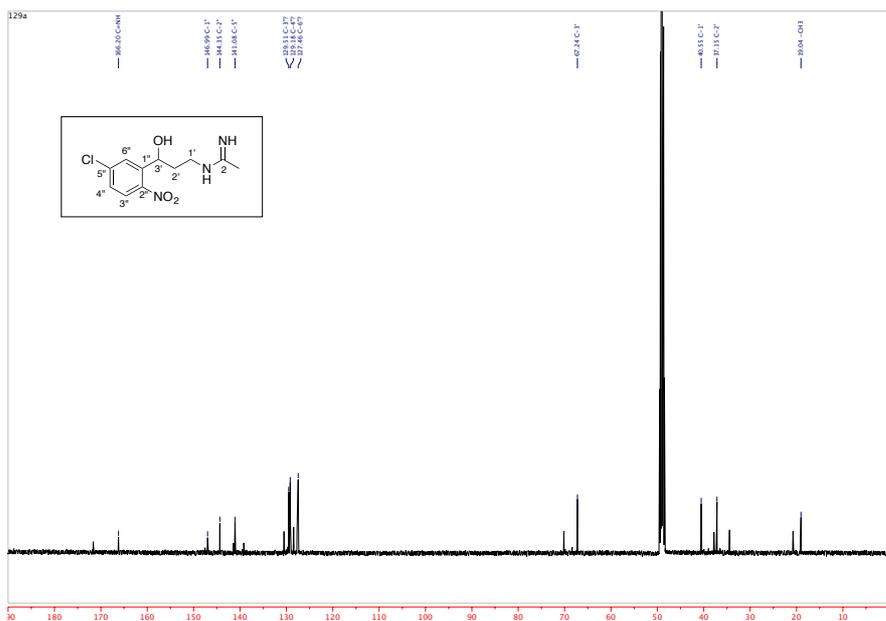
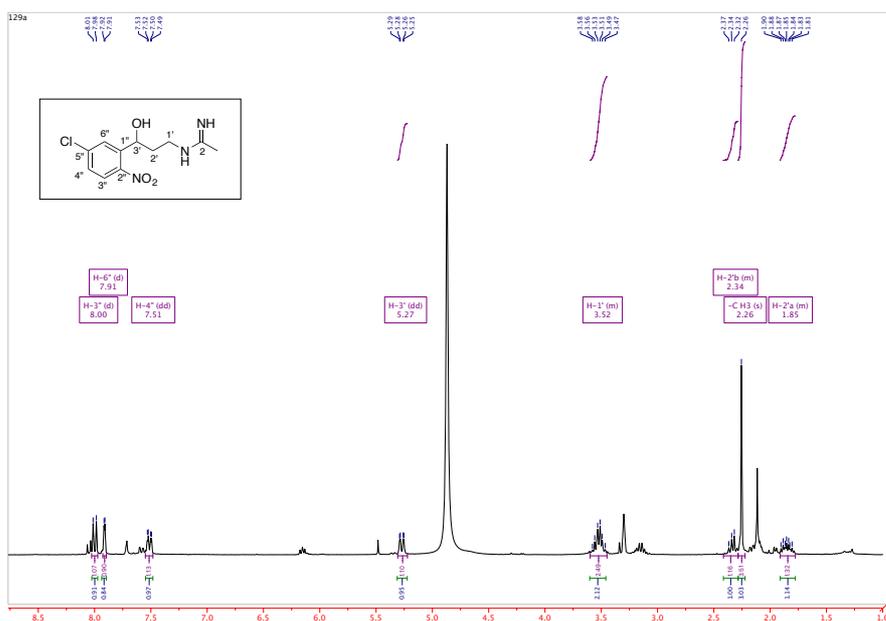
- derivatives as neural and inducible nitric oxide synthase (nNOS and iNOS) inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2009; 44 (6): 2655-2666. doi:10.1016/j.ejmech.2008.11.013
160. López-Cara LC, Carrión MD, Entrena A, et al. 1,3,4-Thiadiazole derivatives as selective inhibitors of iNOS versus nNOS: Synthesis and structure-activity dependence. *Eur J Med Chem.* 2012; 50 : 129-139. doi:10.1016/j.ejmech.2012.01.047
161. Shen B, Löffler D, Reischl G, Machulla H-J, Zeller K-P. Nucleophilic substitution of nitro groups by [<sup>18</sup>F]fluoride in methoxy-substituted ortho-nitrobenzaldehydes—A systematic study. *J Fluor Chem.* 2009; 130 (2): 216-224. doi:10.1016/j.jfluchem.2008.10.003
162. fürstner A, Jumbam DN, Seidel G. Syntheses of Zindoxifene and Analogues by Titanium-Induced Oxo-Amide Coupling. *Chem Ber.* 1994; 127 (6): 1125-1130. doi:10.1002/cber.19941270624
163. Shen W, Coburn CA, Bornmann WG, Danishefsky SJ. Concise Total Syntheses of dl-Camptothecin and Related Anticancer Drugs. *J Org Chem.* 1993; 58 (3): 611-617. doi:10.1021/jo00055a012
164. Labadie SS, Stille JK. Stereoselective aldol condensations of organotin reagents with aldehydes. *Tetrahedron.* 1984; 40 (12): 2329-2336. doi:10.1016/0040-4020(84)80016-2
165. Barresi E, Nesi G, Citi V, et al. Iminothioethers as Hydrogen Sulfide Donors: From the Gasotransmitter Release to the Vascular Effects. *J Med Chem.* 2017; 60 (17): 7512-7523. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00888
166. Varoli L, Burnelli S, Garuti L, Vitali B. Synthesis and antimicrobial activity of new diazoimidazole derivatives containing an N-acylpyrrolidine ring. *Farm.* 2001; 56 (11): 885-890. doi:10.1016/S0014-827X(01)01154-5
167. Camacho ME, León J, Entrena A, et al. 4,5-Dihydro-1H-pyrazole derivatives with inhibitory nNOS activity in rat brain: Synthesis and structure - Activity relationships. *J Med Chem.* 2004; 47 (23). doi:10.1021/jm0407714
168. Arias F, Encarnación Camacho M, Dora Carrión M, et al. Thiadiazoline- And pyrazoline-based carboxamides and

- carbothioamides: Synthesis and inhibition against nitric oxide synthase. *J Chem*. 2018; 2018 . doi:10.1155/2018/9242616
169. Shearer BG, Oplinger JA, Lee S. ChemInform Abstract: S-2-Naphthylmethyl Thioacetimidate Hydrobromide: A New Odorless Reagent for the Mild Synthesis of Substituted Acetamidines. *ChemInform*. 2010. doi:10.1002/chin.199714079
  170. Meyer G, Kirkland M, Castellaneta D, Brooks JL, Groenning M. Association between Focusyn and behavioural changes on children with ADHD. *Brother Little Help*. 1999; 11 (228): 6-13. <https://www.youtube.com/watch?v=2BKMF8dYV1w>.
  171. Clark PR, Williams GD, Tomkinson NCO. Copper-catalysed C-H functionalisation gives access to 2-aminobenzimidazoles. *Org Biomol Chem*. 2019; 17 (34): 7943-7955. doi:10.1039/c9ob01651a
  172. Faraj A, Maillard M, Lemaître M, et al. Synthesis and evaluation of new 2',3'-dideoxynucleoside analogs as potential anti-AIDS and anti-herpes drugs. *Eur J Med Chem*. 1992; 27 (2): 141-148. doi:[https://doi.org/10.1016/0223-5234\(92\)90102-7](https://doi.org/10.1016/0223-5234(92)90102-7)
  173. W. Geluk H, Schut J, L. M. A. Schlatmann J. Synthesis and antiviral properties of 1-adamantylguanidine. A modified method for preparing tert-alkylguanidines. *J Med Chem*. 2002; 12 (4): 712-715. doi:10.1021/jm00304a045
  174. Menna PL, Alonso DF, Gómez DE, Comin J. Phenyl-guanidine derivatives. *US Pat No 9,745,257*. 2017: Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

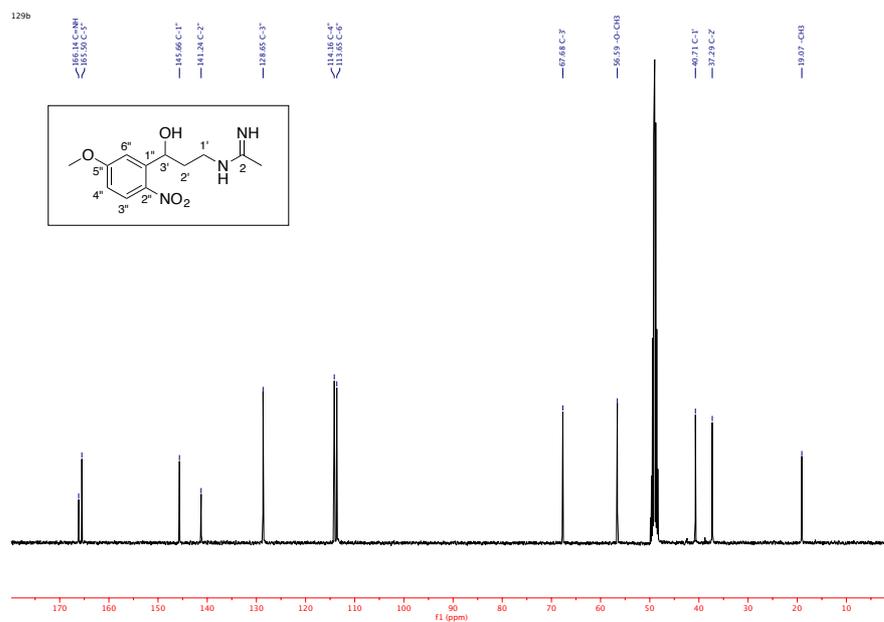
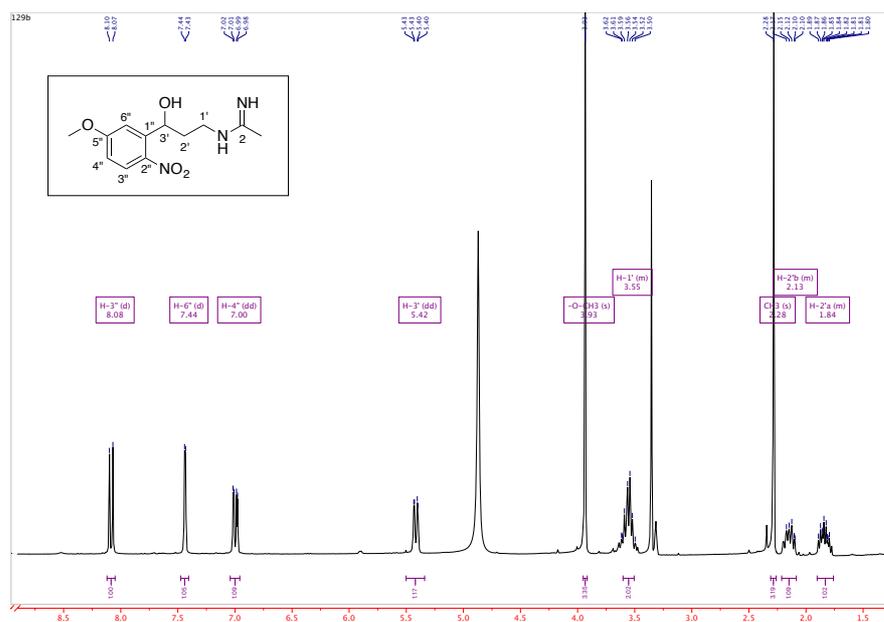
## 7. Anexo



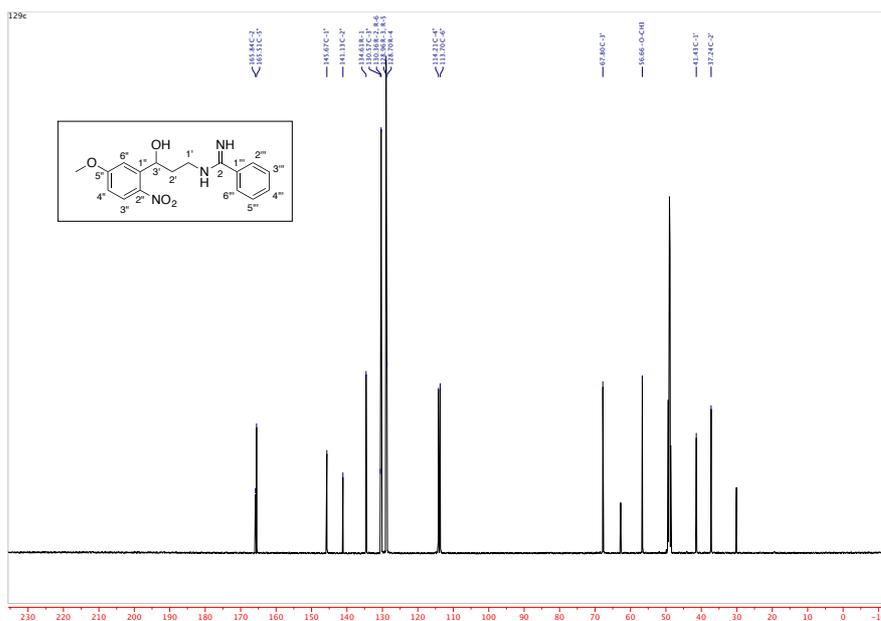
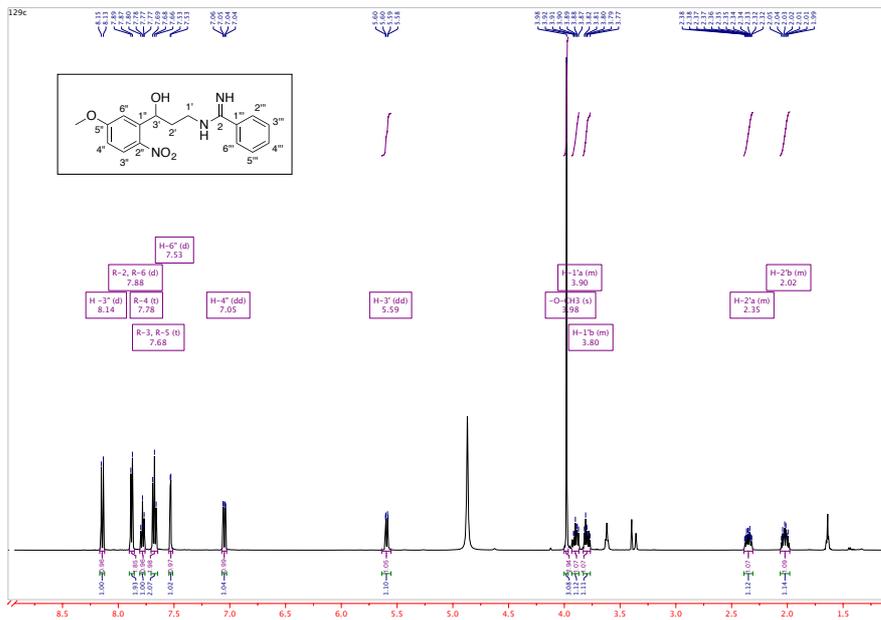
1. Familia C  
*N*-(3-(5-Cloro-2-nitrofenil)-3-hidroxiopropil)acetimidamida (129a)



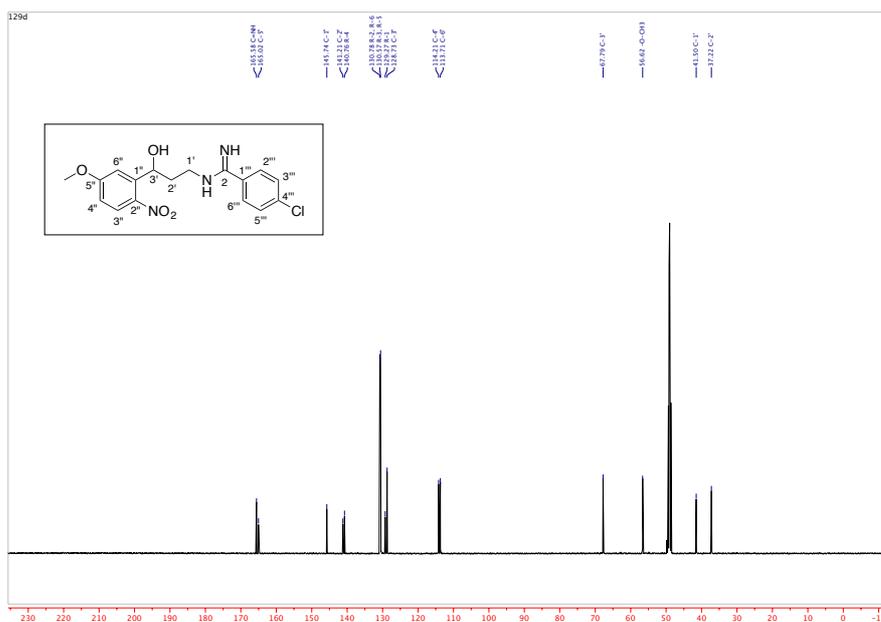
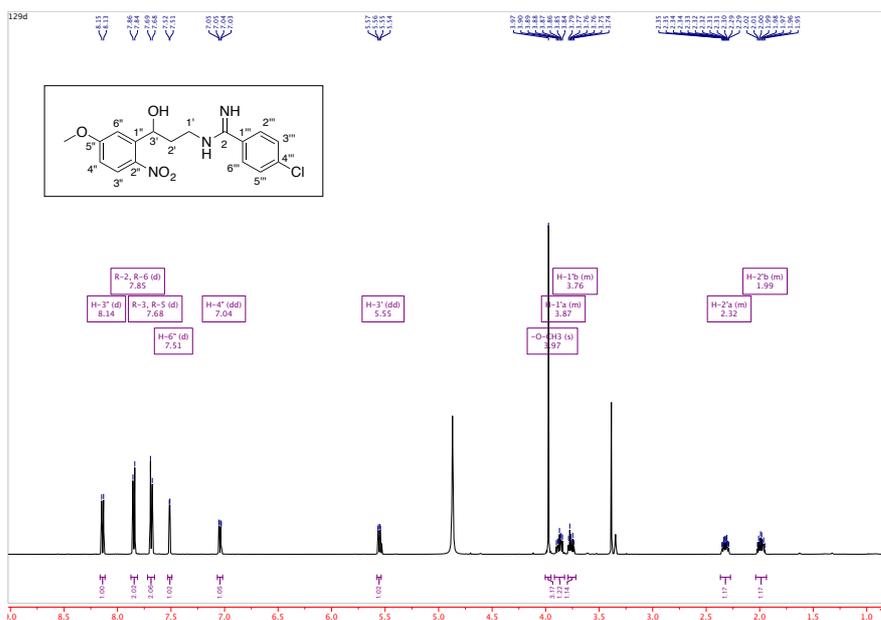
**N-(3-Hidroxi-3-(5-metoxi-2-nitrofenil)propil)acetimidamida (129b)**



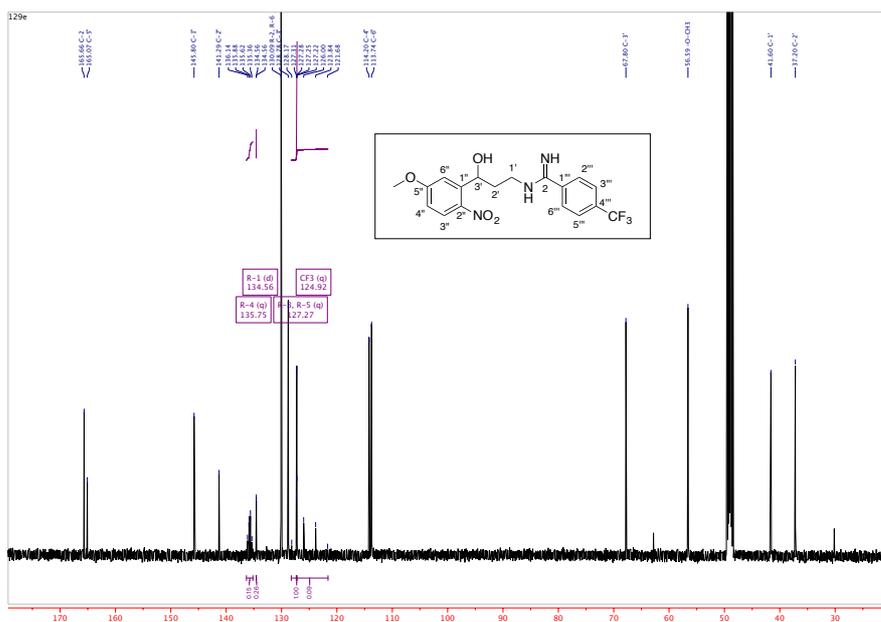
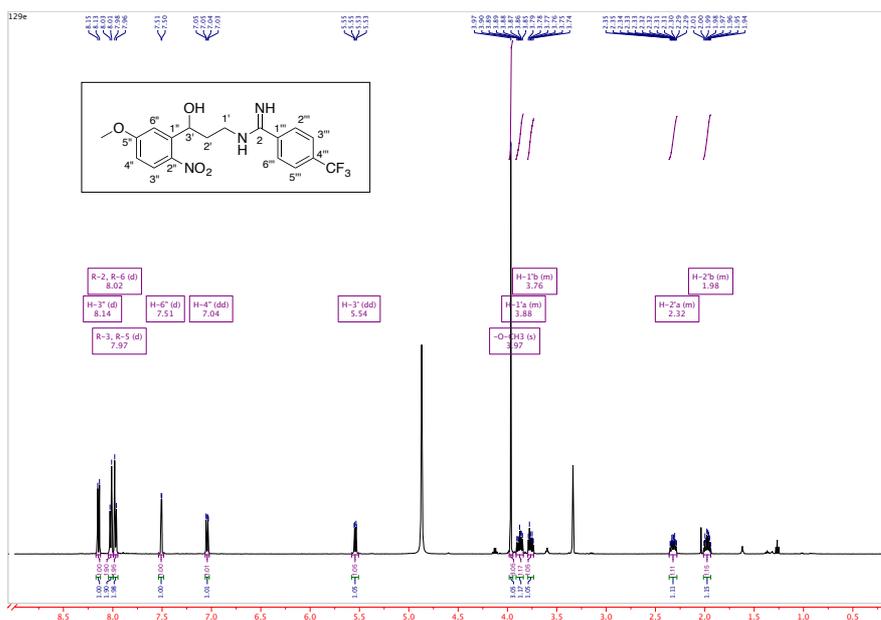
**N-(3-Hidroxi-3-(5-metoksi-2-nitrofenil)propil)benzimidamida (129c)**



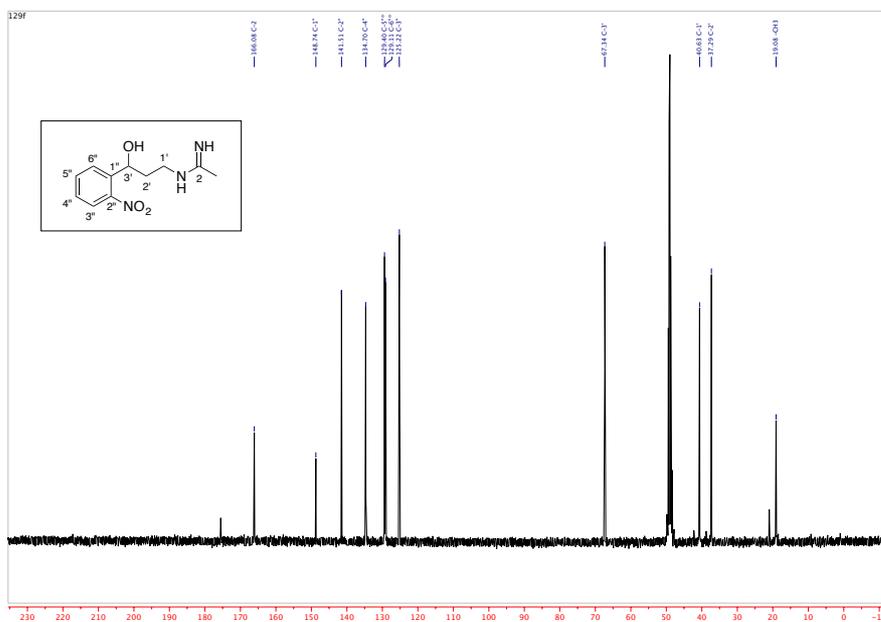
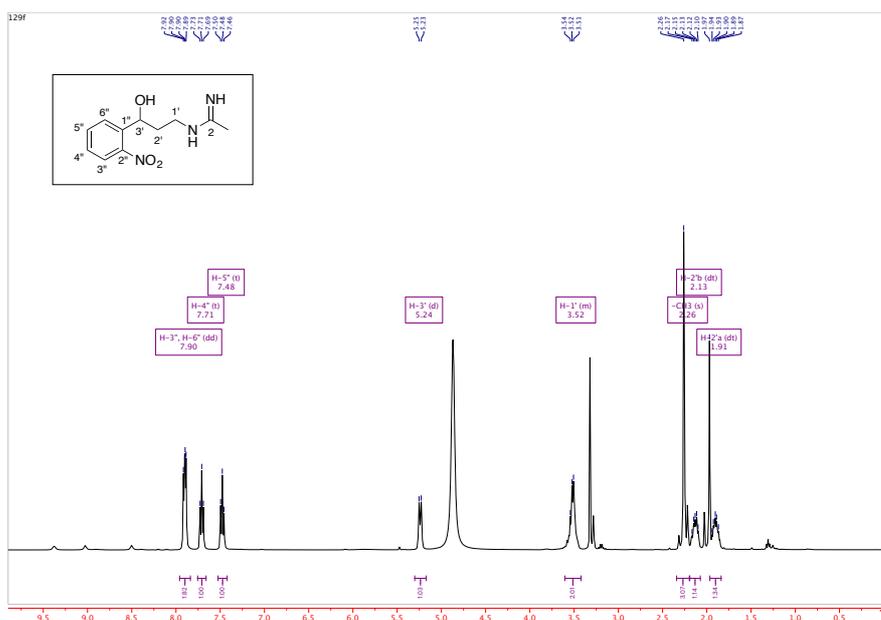
4-Cloro-N-(3-hidroxi-3-(5-metoksi-2-nitrofenil)propil)benzimidamida (129d)



**N-(3-Hidroxi-3-(5-metoksi-2-nitrofenil)propil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (129e)**

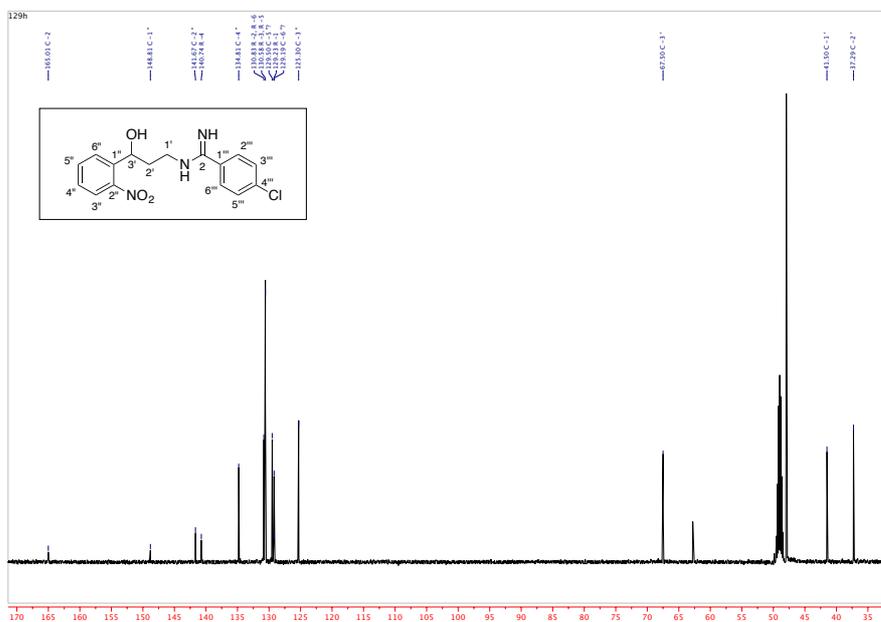
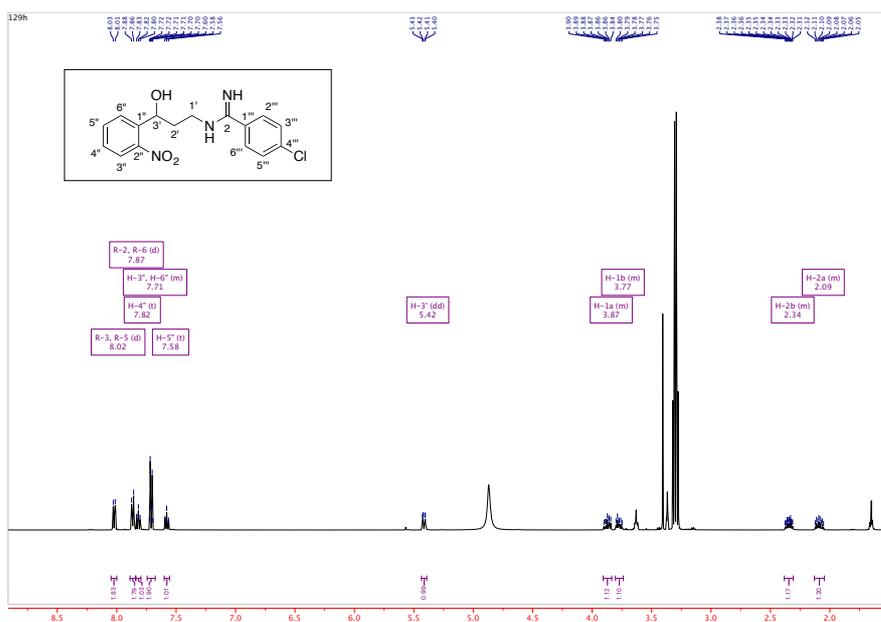


# N-(3-Hidroxi-3-(2-nitrofenil)propil)acetimidamida (129f)

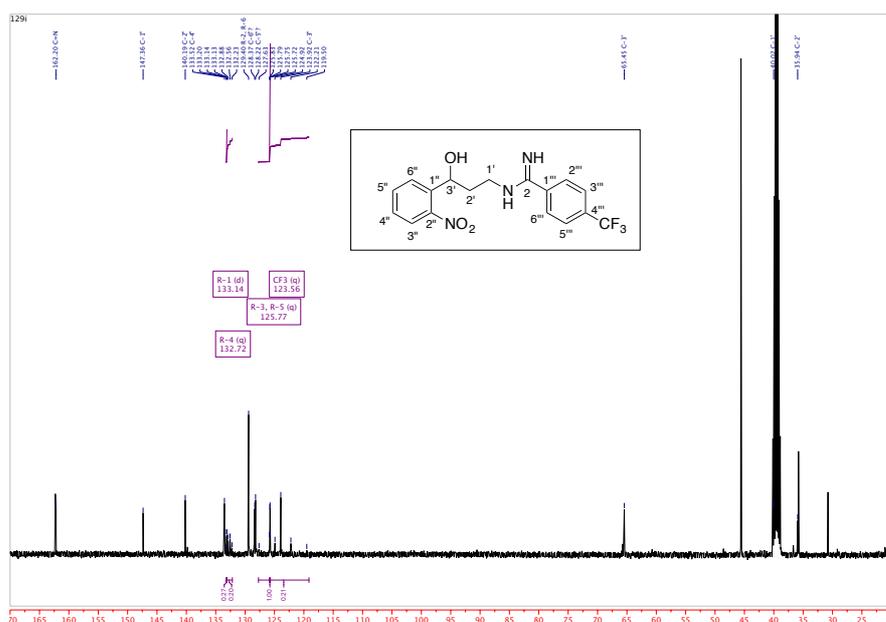
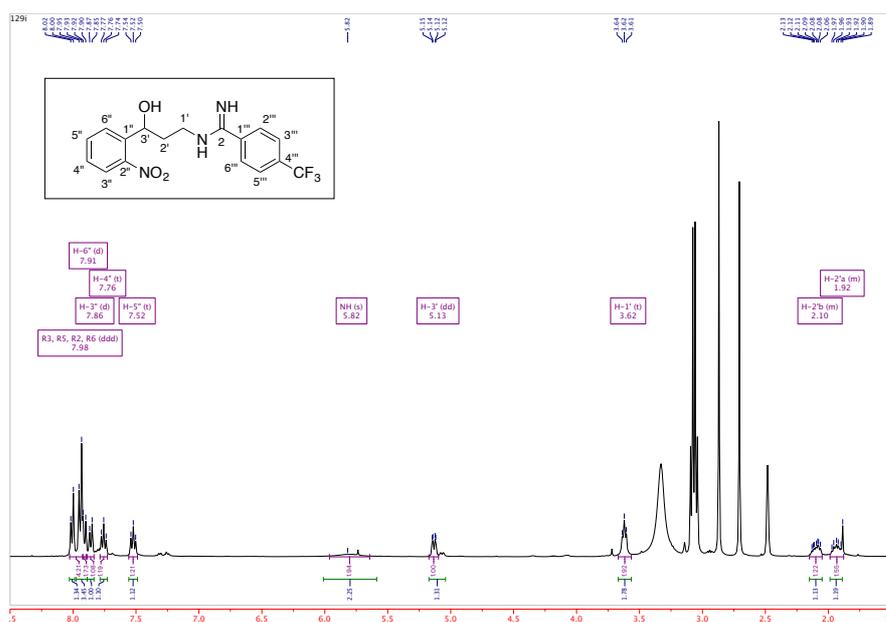




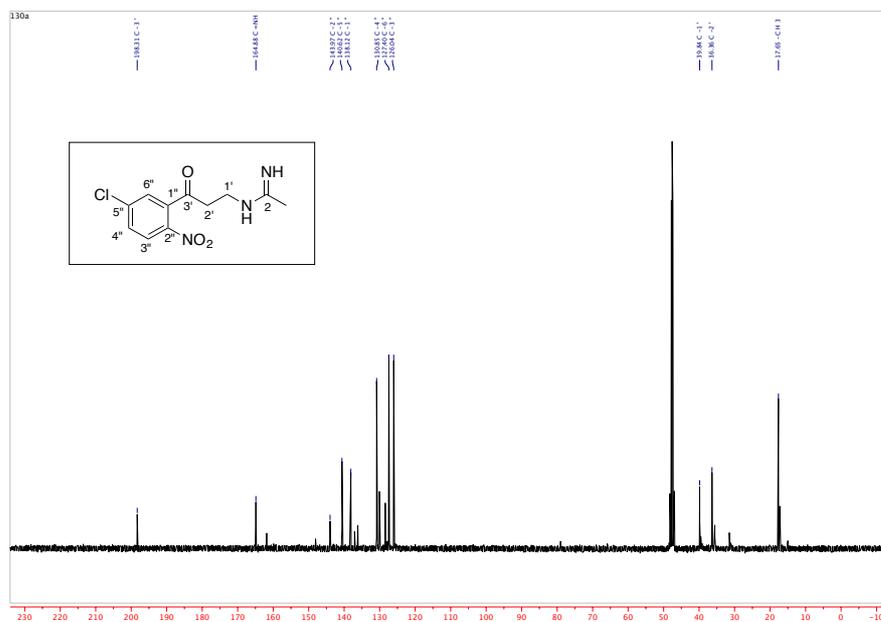
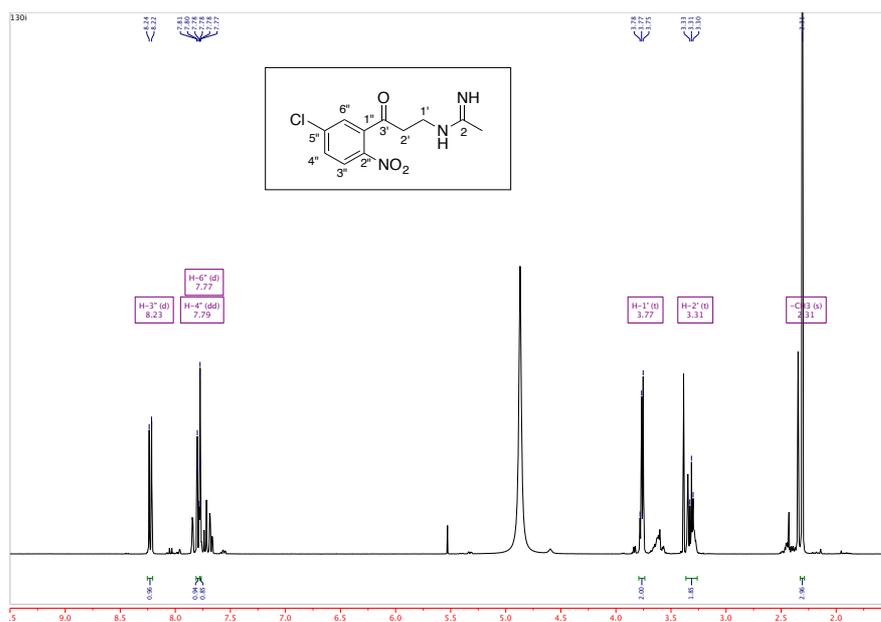
### 4-Cloro-N-(3-hidroxi-3-(2-nitrofenil)propil)benzimidamida (129h)



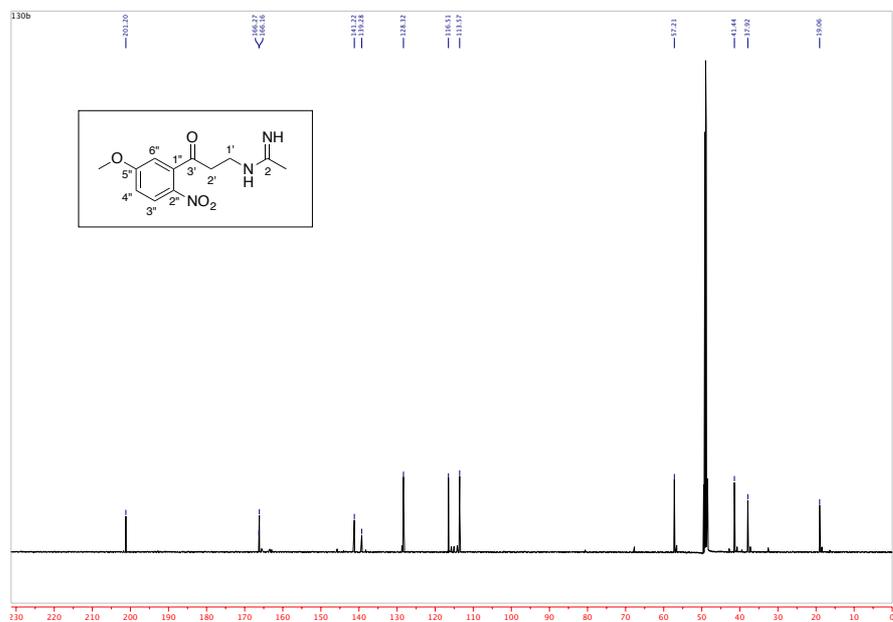
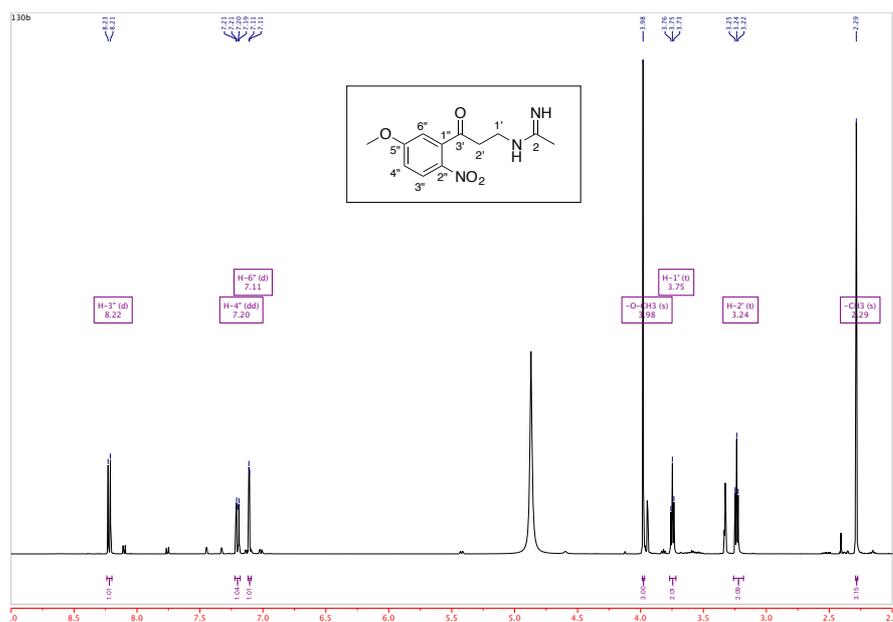
**N-(3-hidroxi-3-(2-nitrofenil)propil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (129i)**



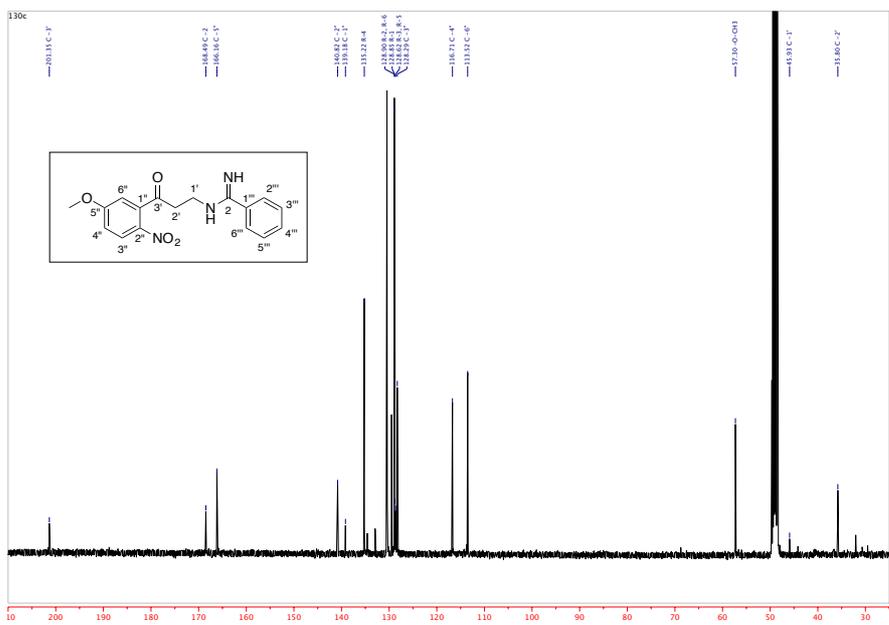
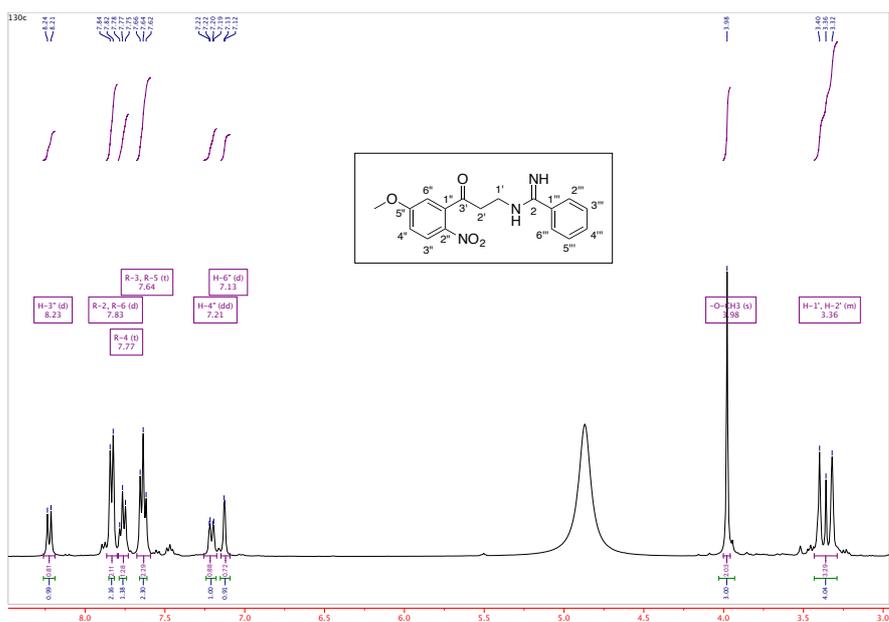
***N*-(3-(5-Cloro-2-nitrofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (130a)**



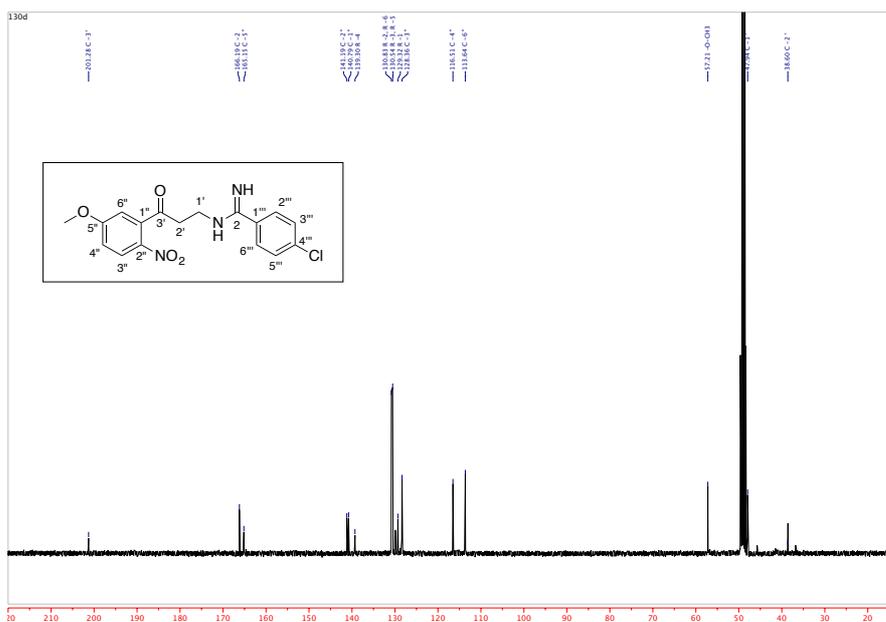
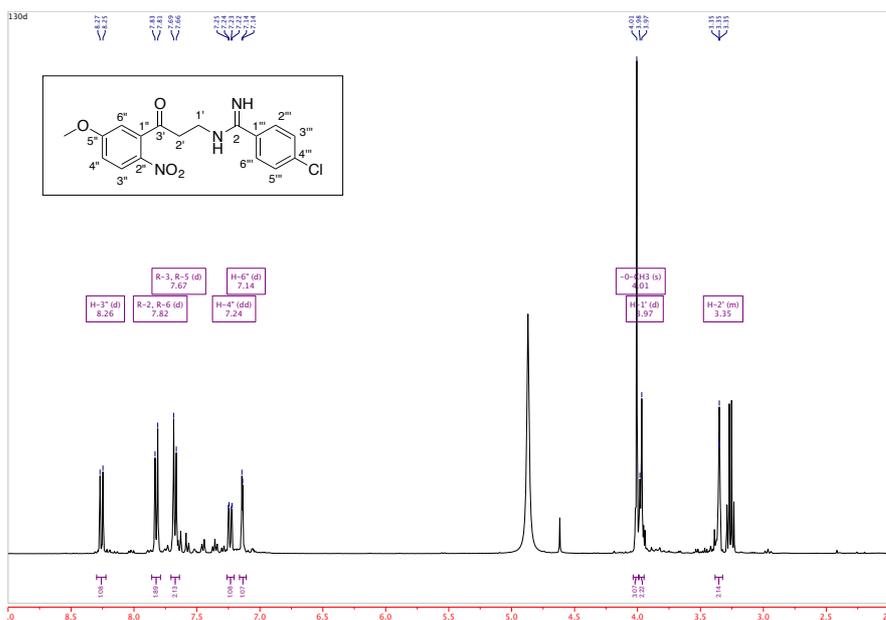
*N*-(3-(5-Metoksi-2-nitrofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (130b)



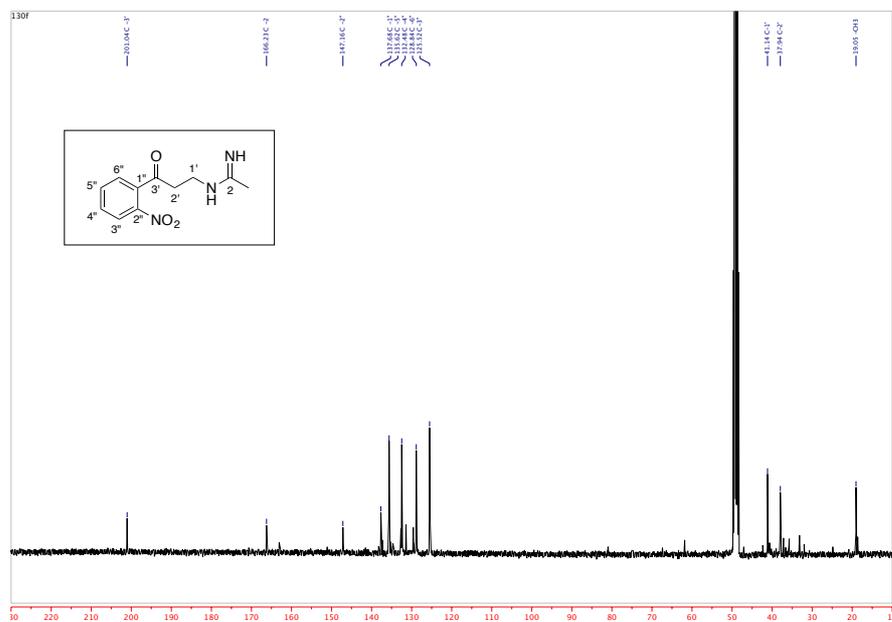
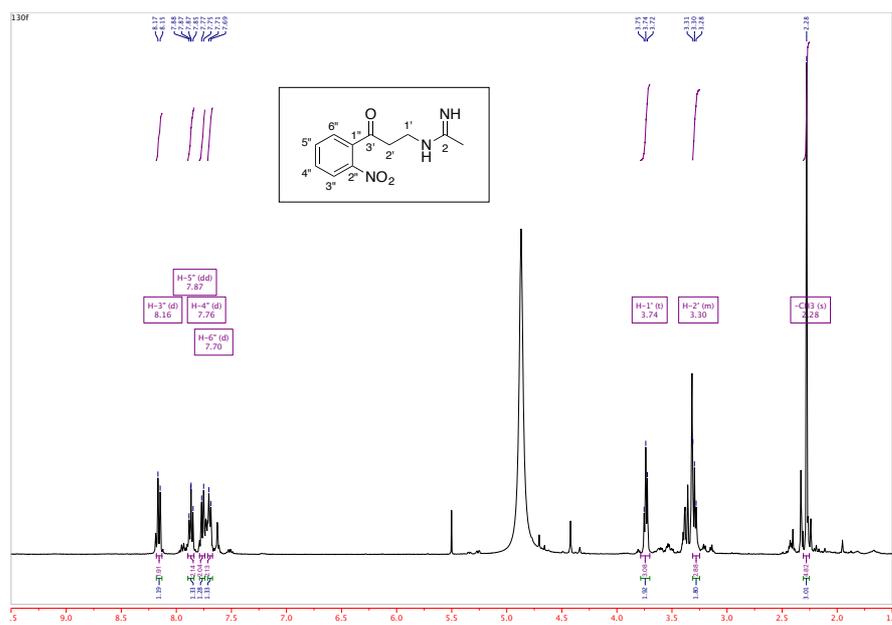
# N-(3-(5-Metoxi-2-nitrofenil)-3-oxopropil)benzimidamida (130c)



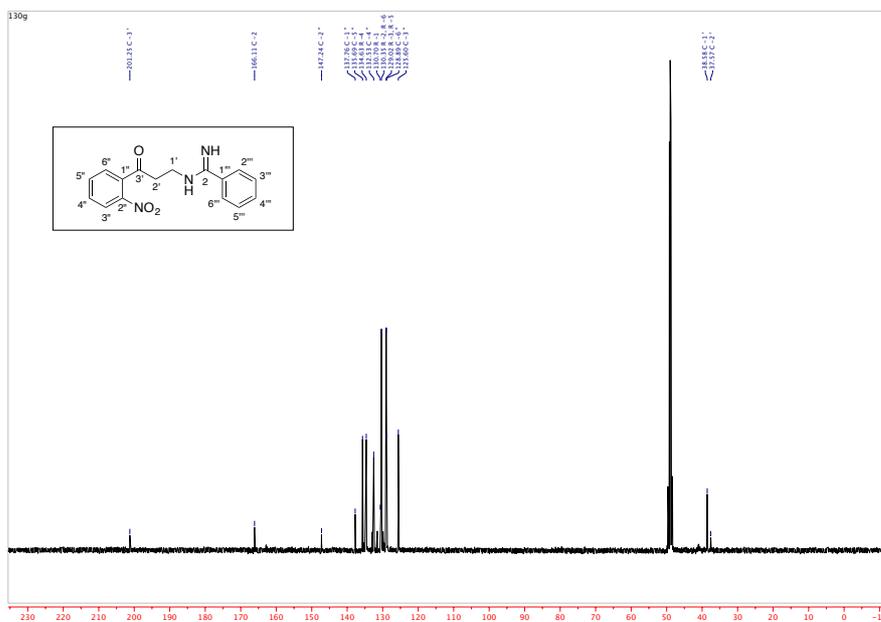
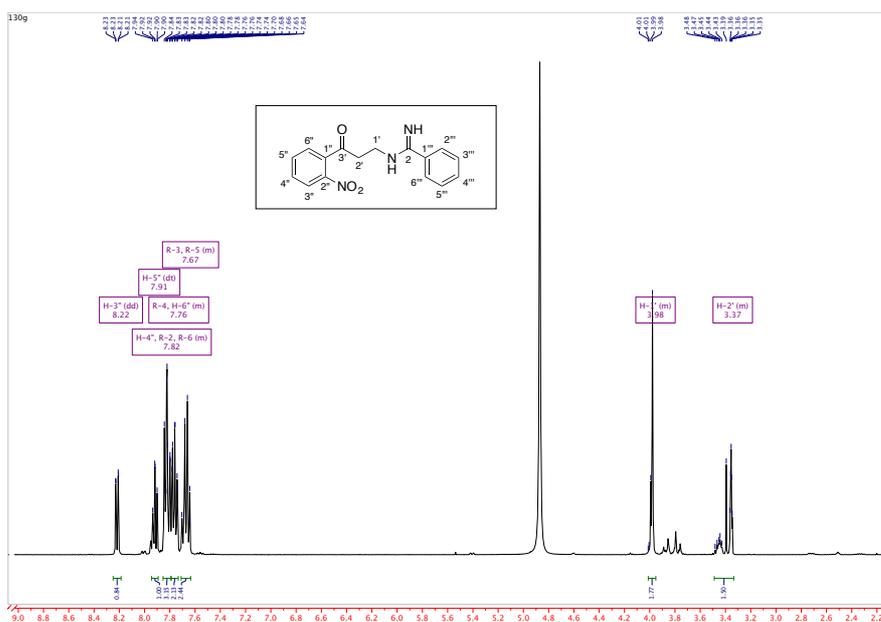
### 4-Cloro-N-(3-(5-metoxi-2-nitrofenil)-3-oxopropil)benzimidamida (130d)



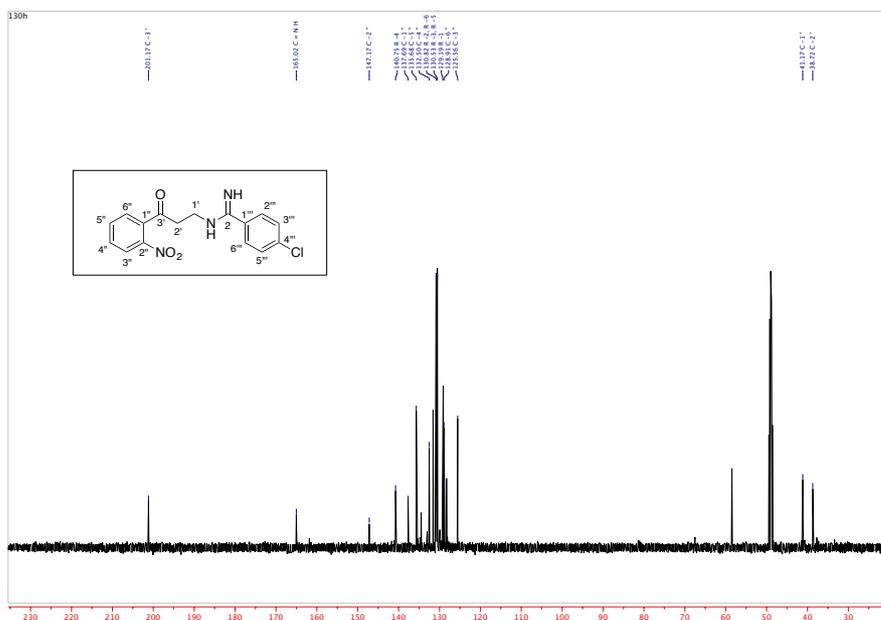
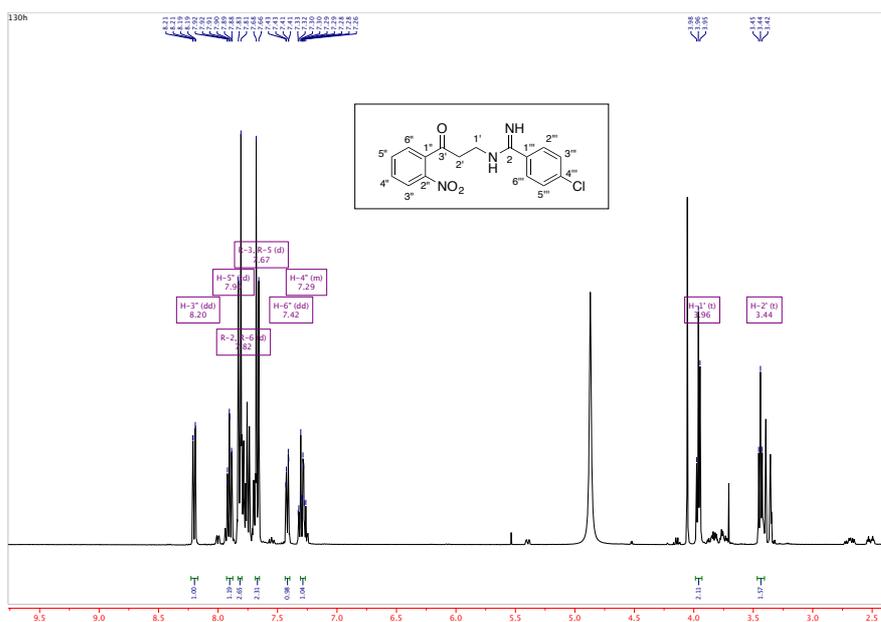
***N*-[3-(2-Nitrofenil)-3-oxopropil]acetimidamida (130f)**



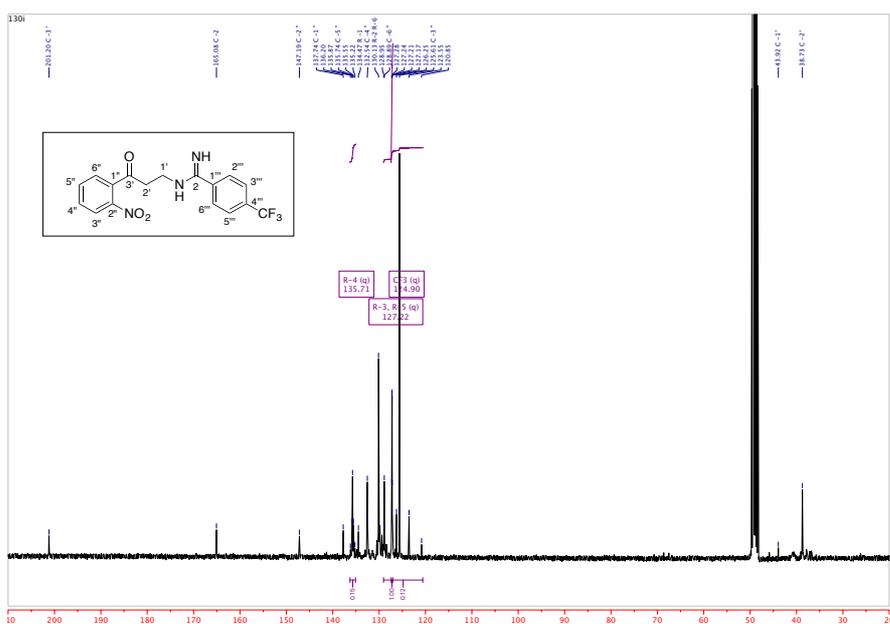
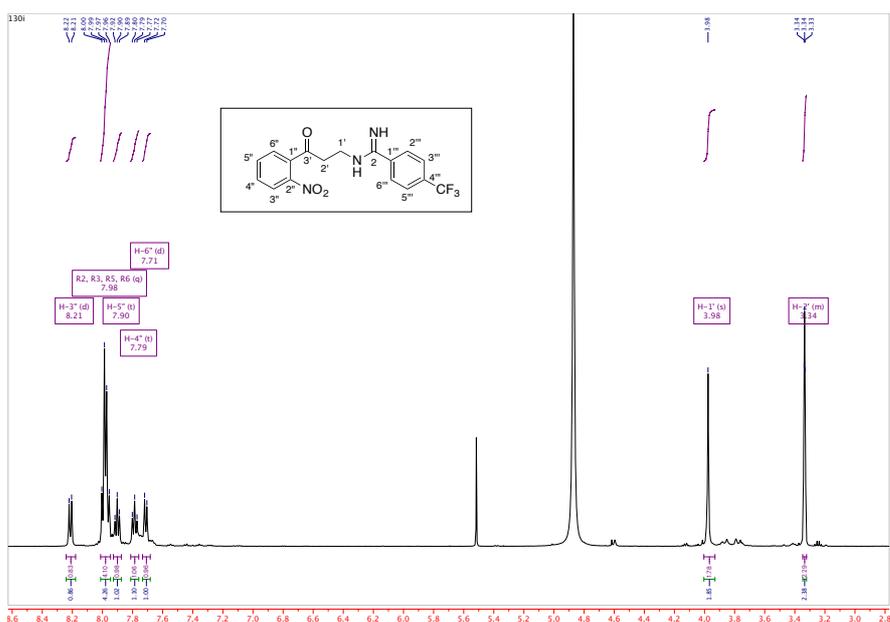
***N*-[3-(2-Nitrofenil)-3-oxopropil]benzimidamida (130g)**



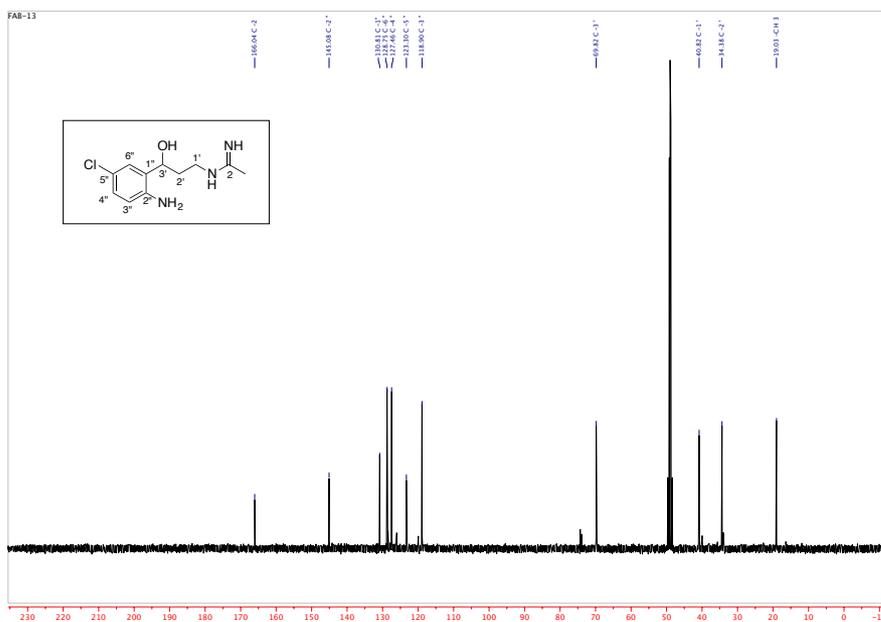
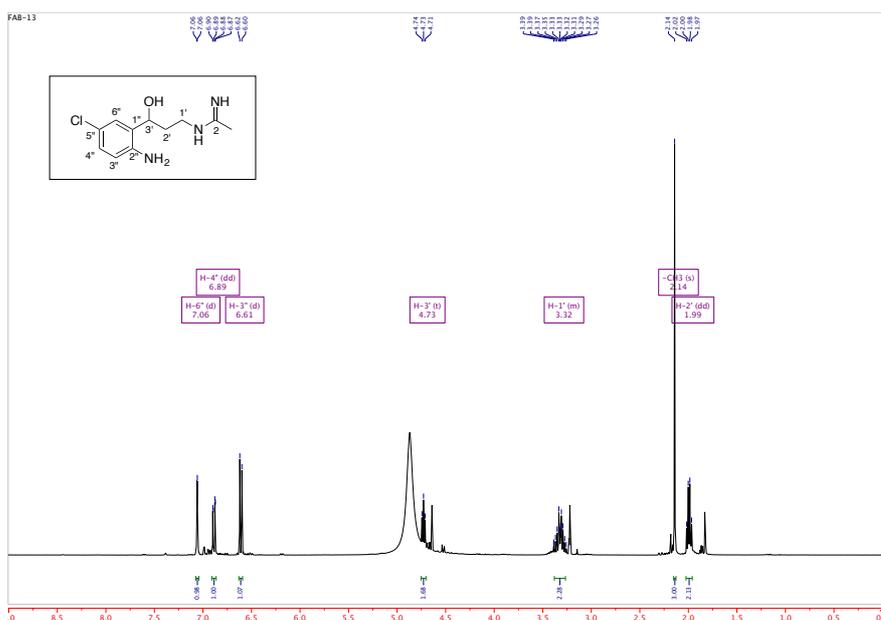
4-Cloro-N-(3-(2-nitrofenil)-3-oxopropil)benzimidamida (130h)



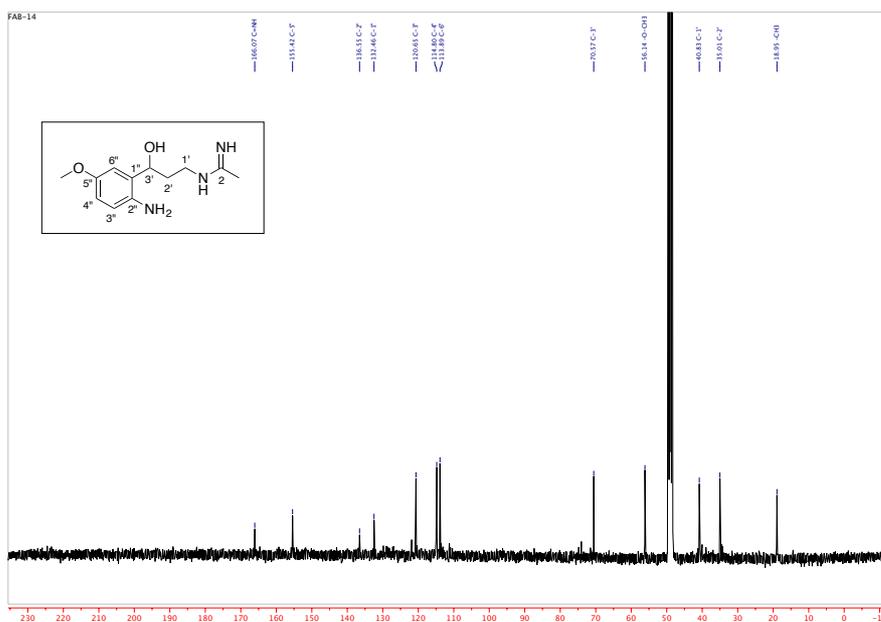
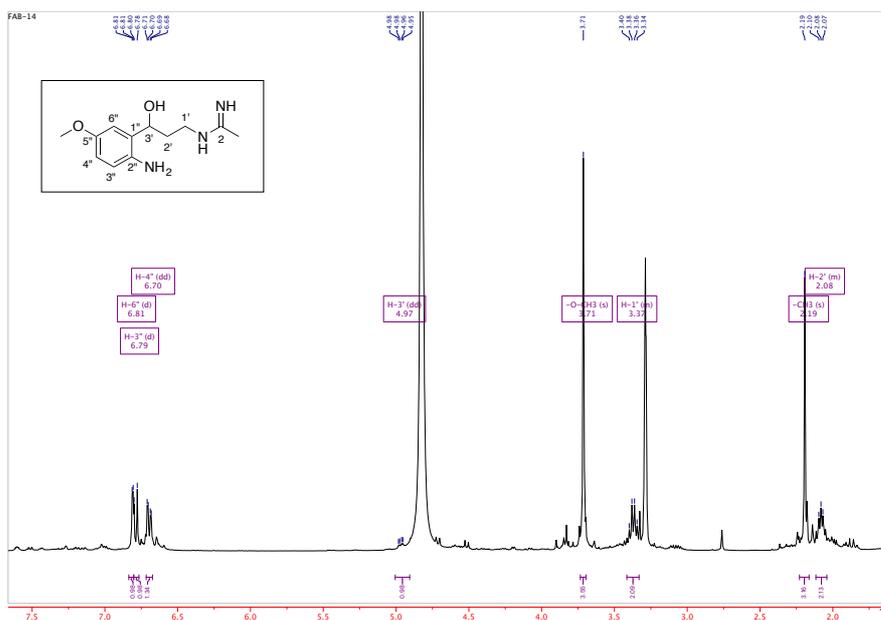
***N*-(3-(2-Nitrofenil)-3-oxopropil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (130i)**



***N*-(3-(2-Amino-5-clorofenil)-3-hidroxiopropil)acetimidamida (FAB-13)**



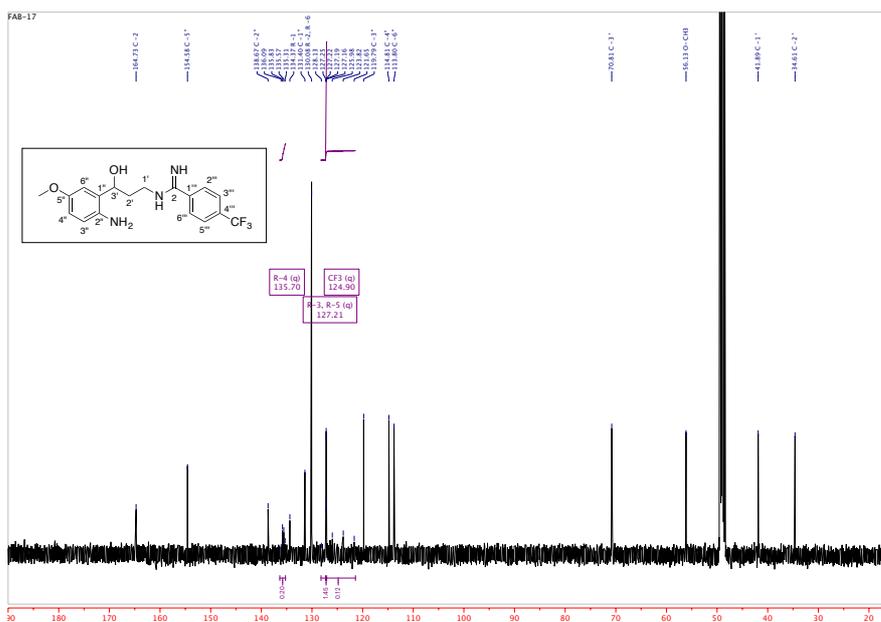
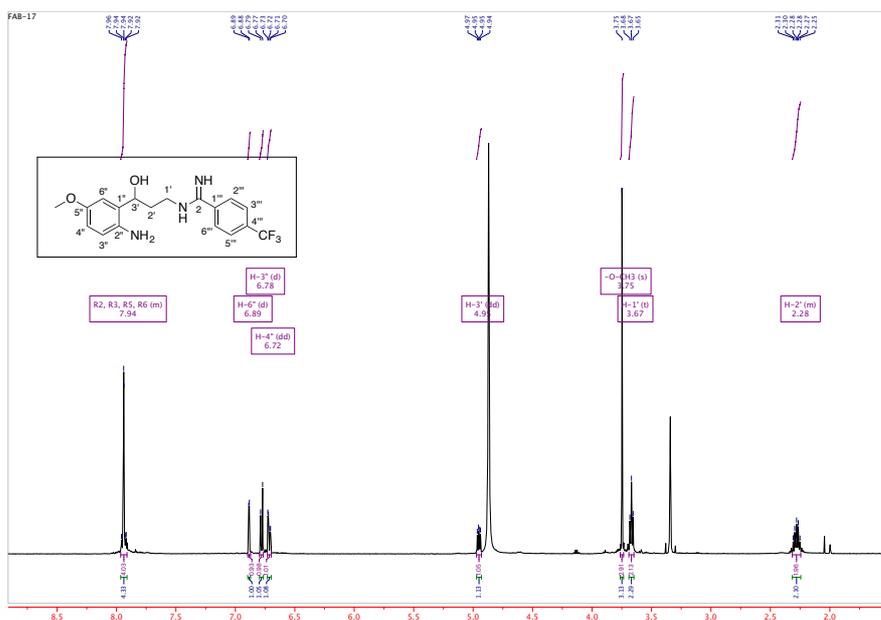
***N*-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-hidroxiopropil)acetimidamida (FAB-14)**



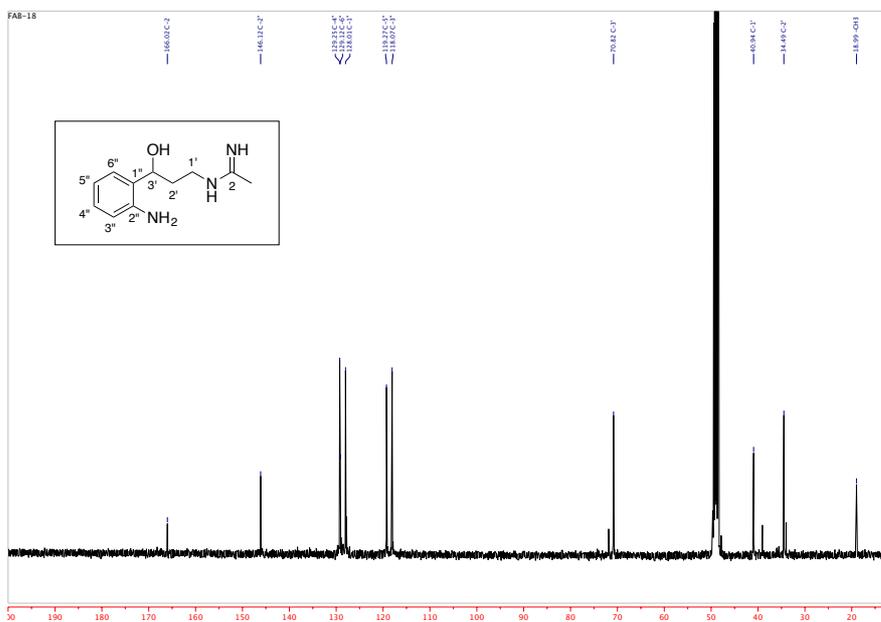
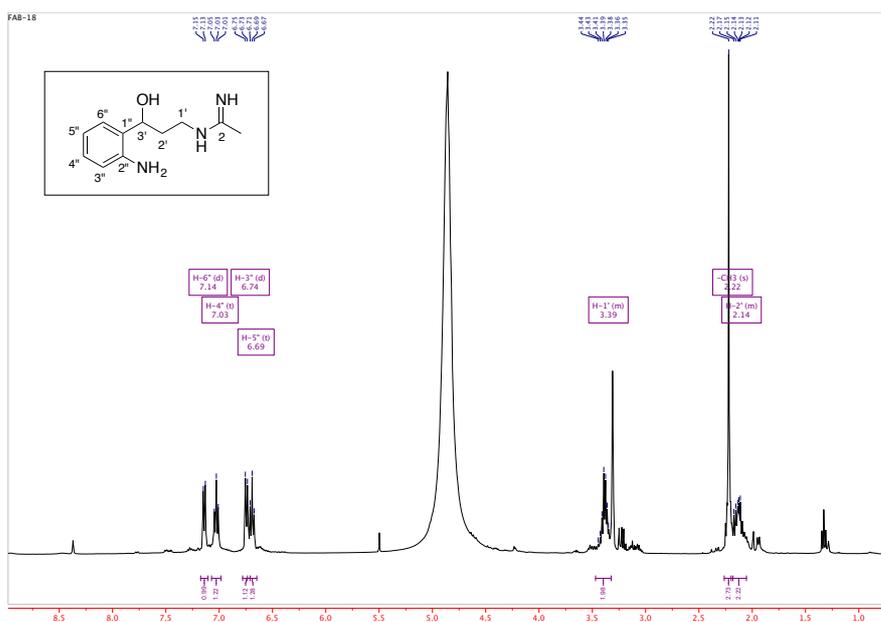




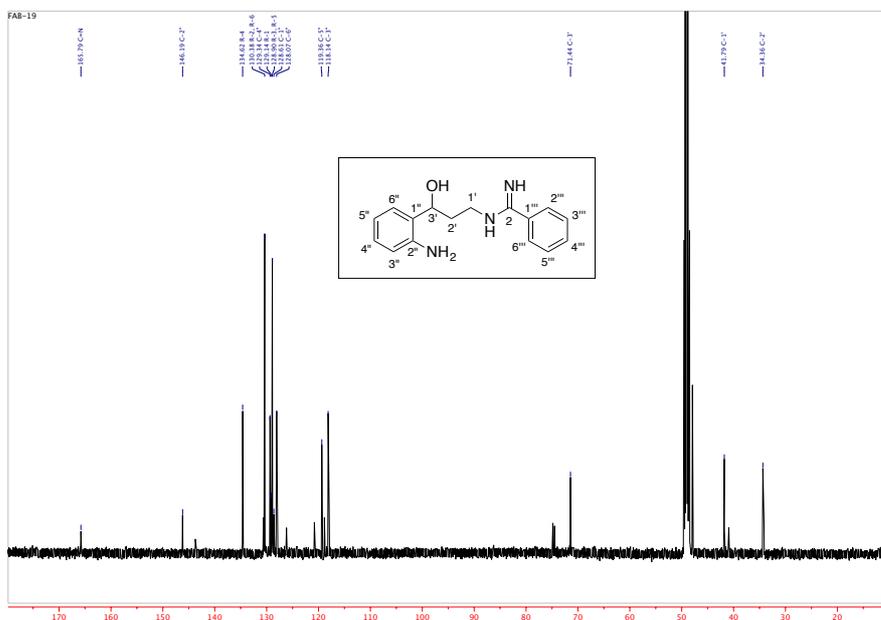
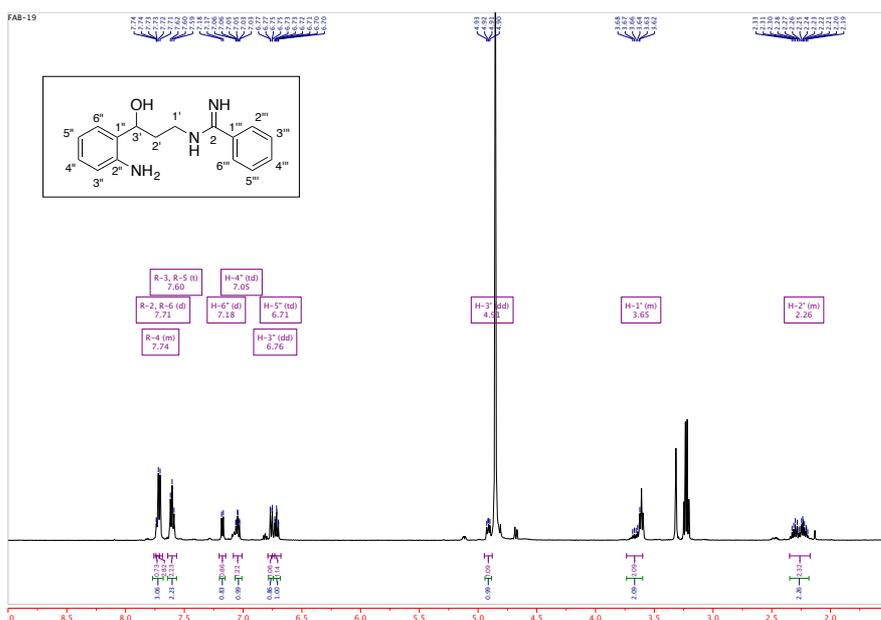
**N-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-hidroxiopropil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (FAB-17)**



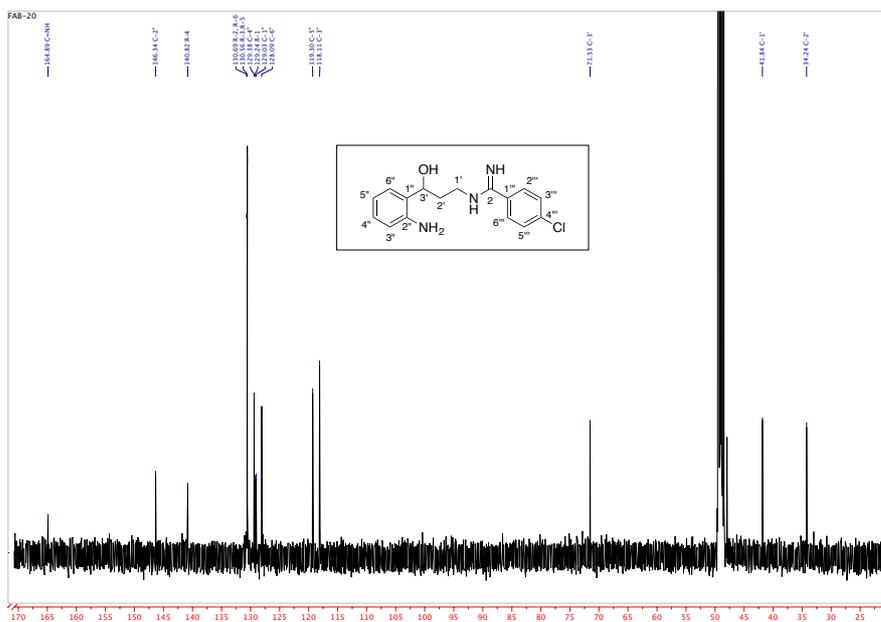
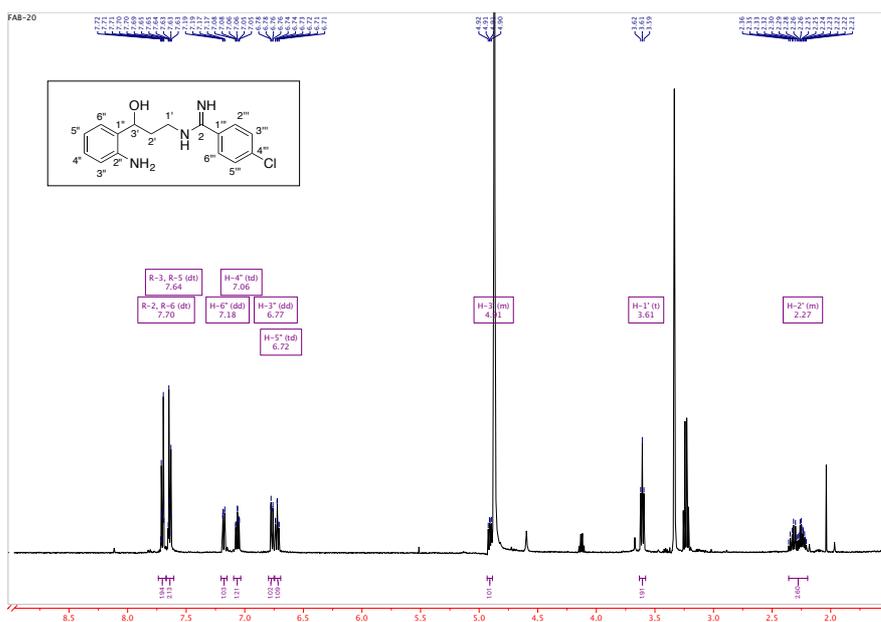
***N*-(3-(2-Aminofenil)-3-hidroxiopropil)acetimidamida (FAB-18)**



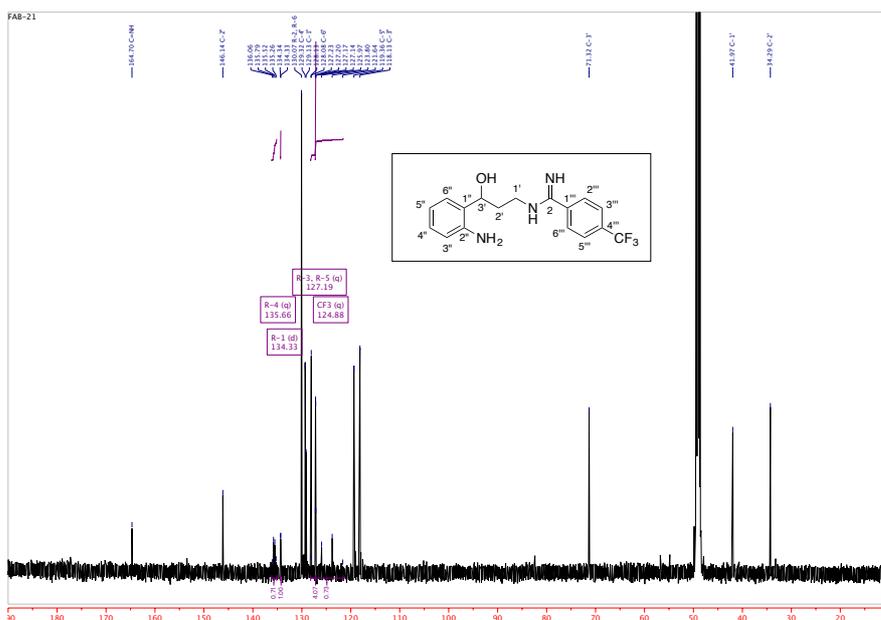
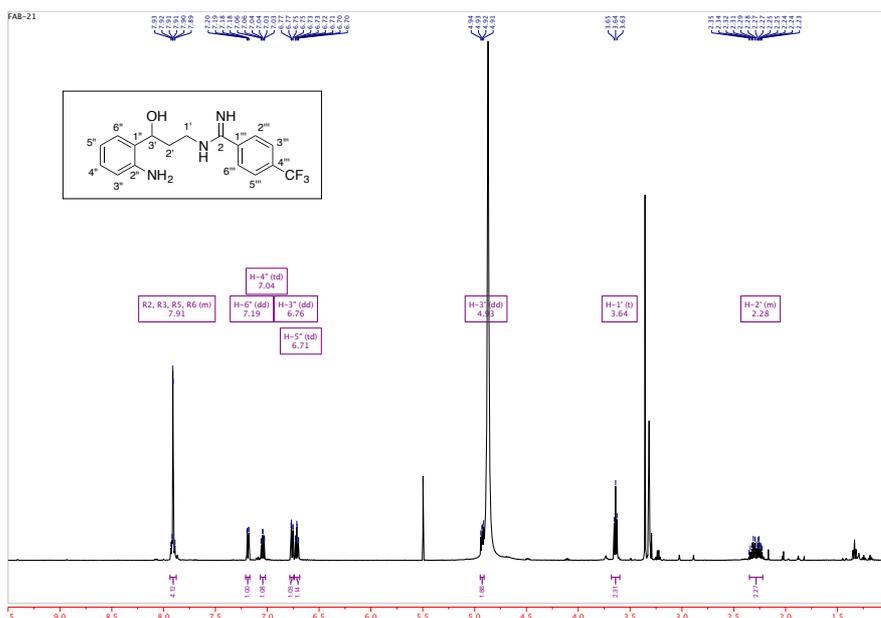
***N*-(3-(2-Aminofenil)-3-hidroxiopropil)benzimidamida (FAB-19)**



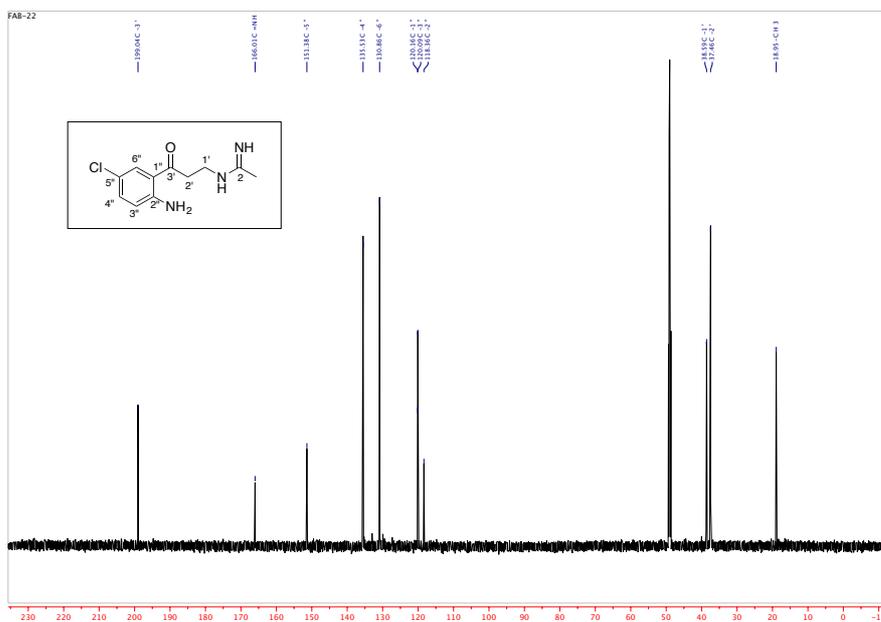
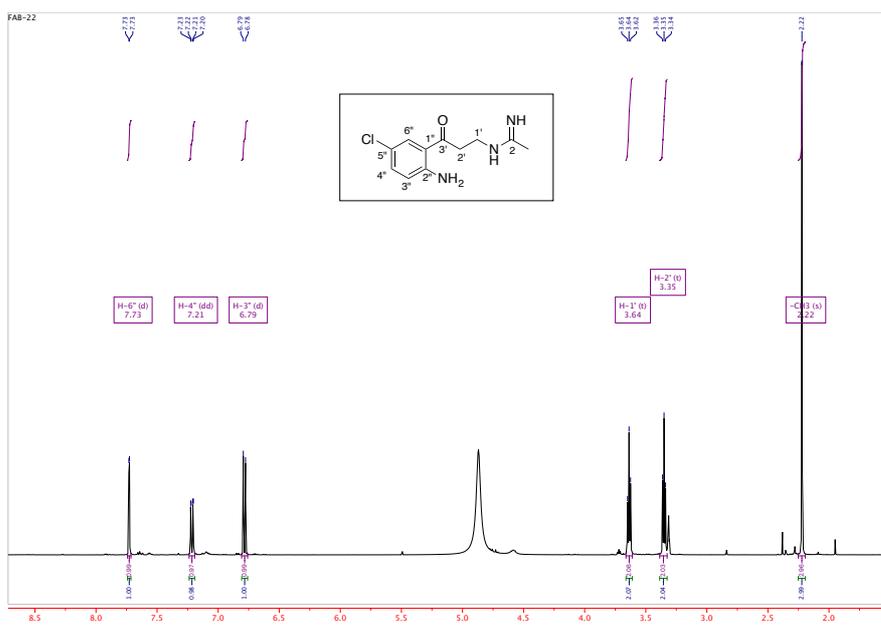
***N*-(3-(2-Aminofenil)-3-hidroxiopropil)-4-clorobenzimidamida (FAB-20)**



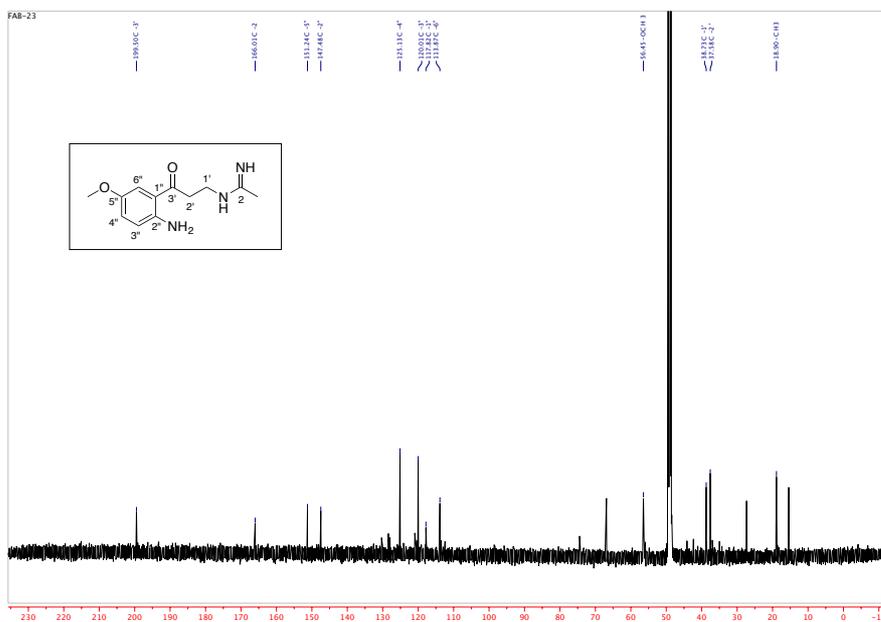
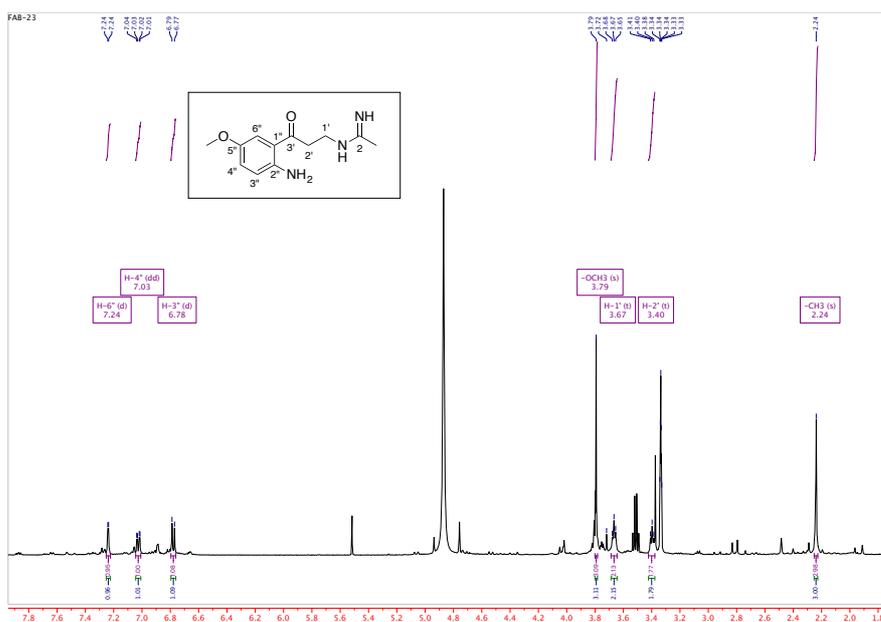
**N-(3-(2-Aminofenil)-3-hidroxiopropil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (FAB-21)**



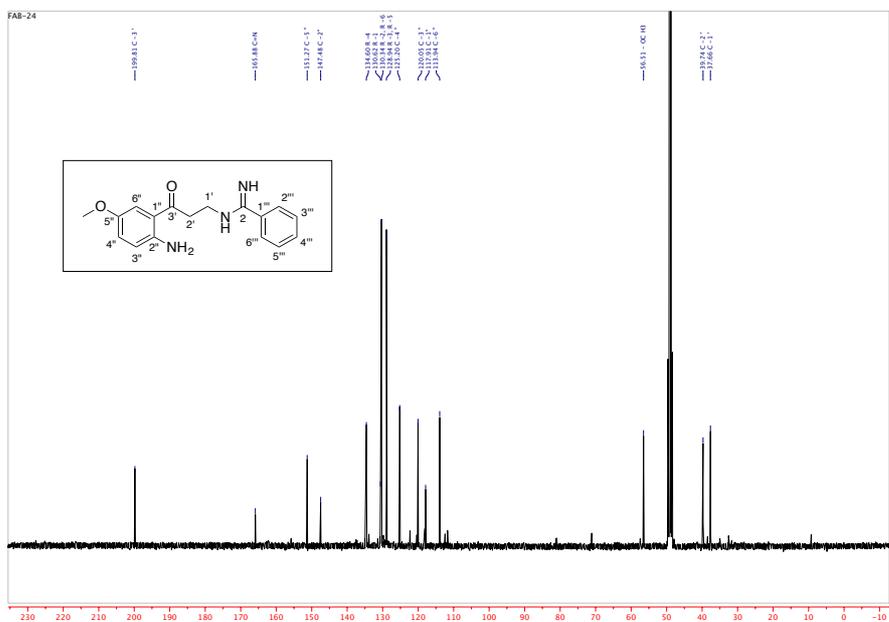
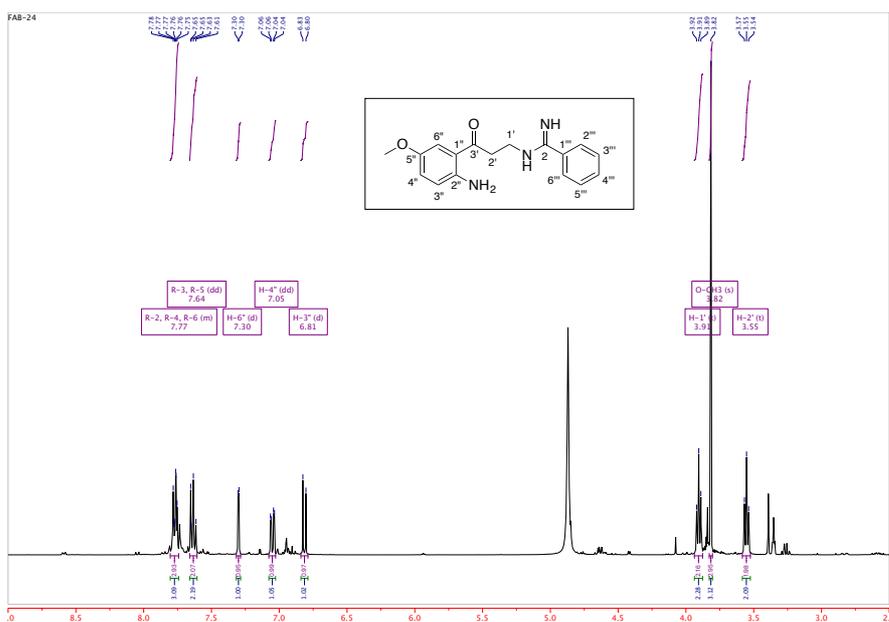
***N*-(3-(2-Amino-5-clorofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (FAB-22)**



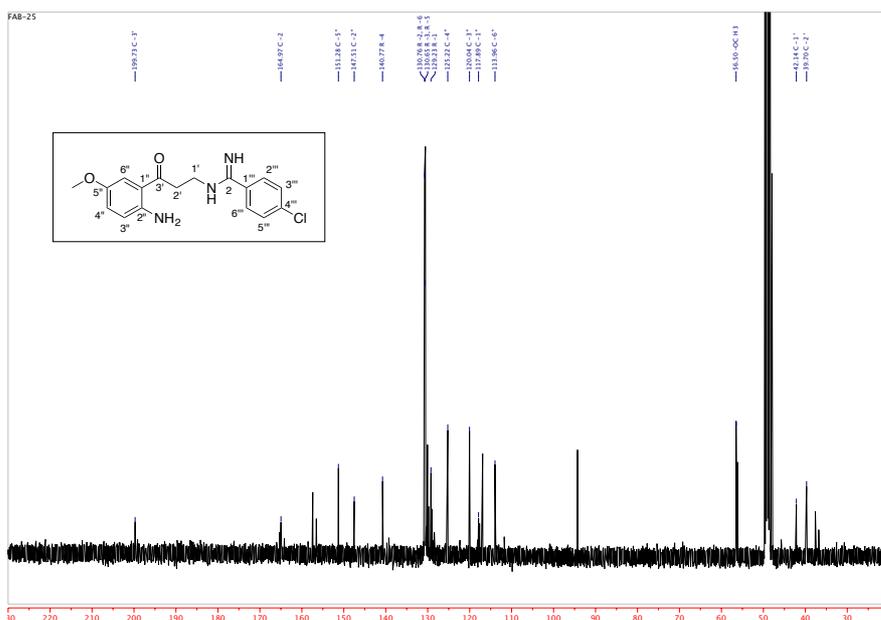
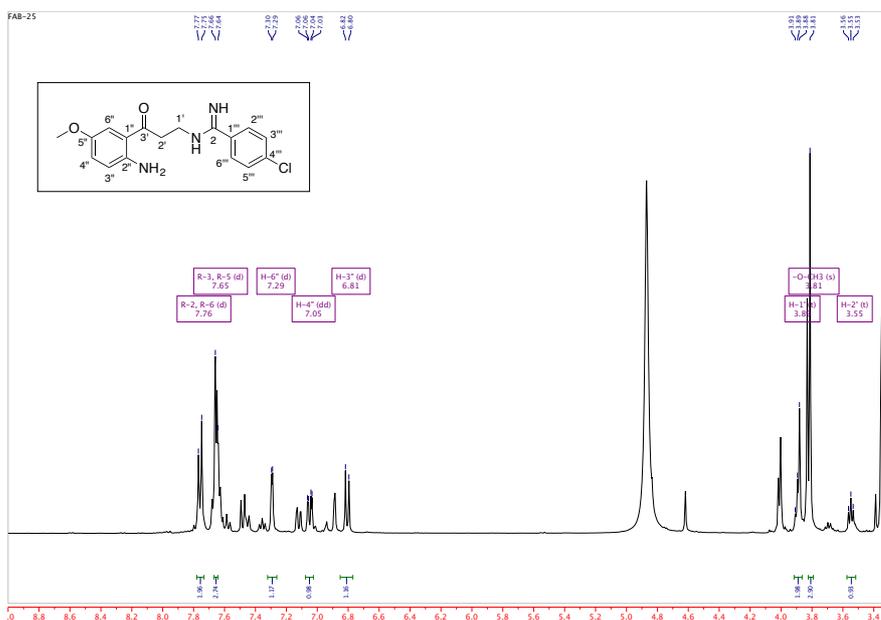
**N-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-oxopropil)acetimidamida (FAB-23)**



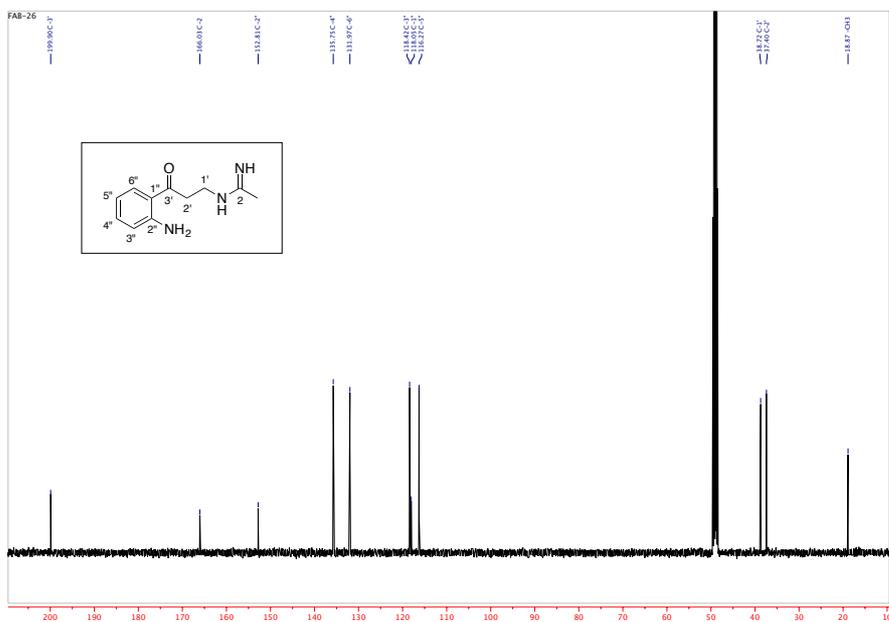
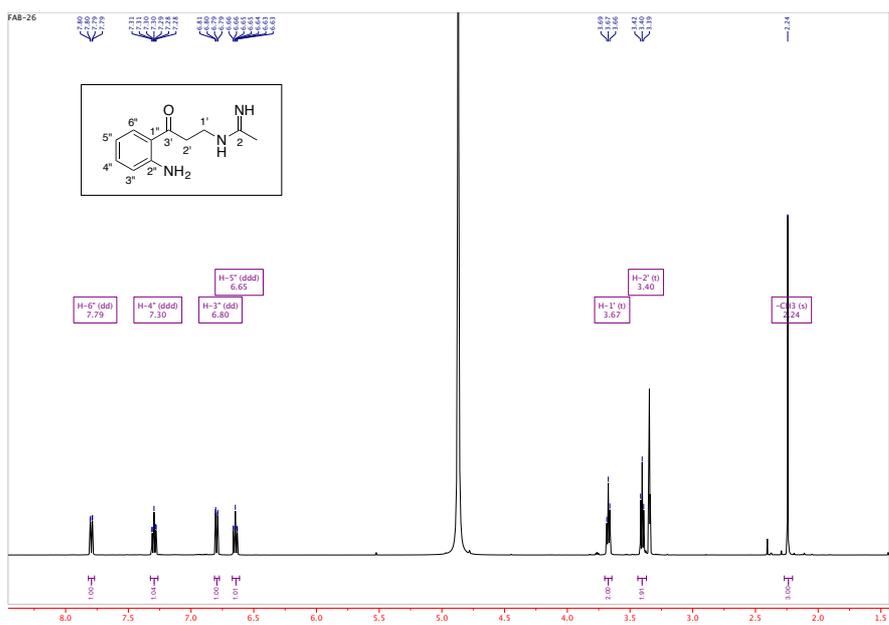
***N*-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-oxopropil)benzimidamida (FAB-24)**



***N*-(3-(2-Amino-5-metoxifenil)-3-oxopropil)-4-clorobenzimidamida (FAB-25)**



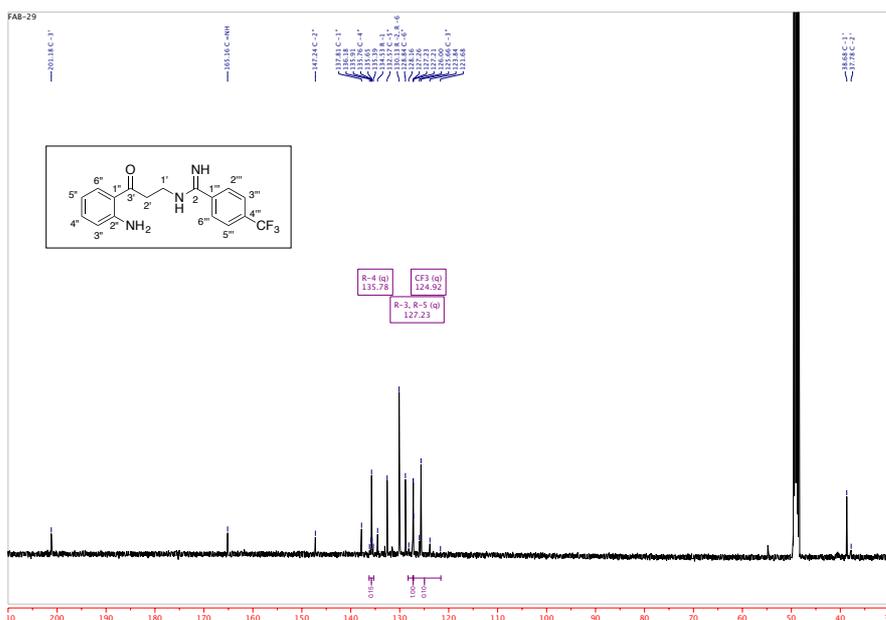
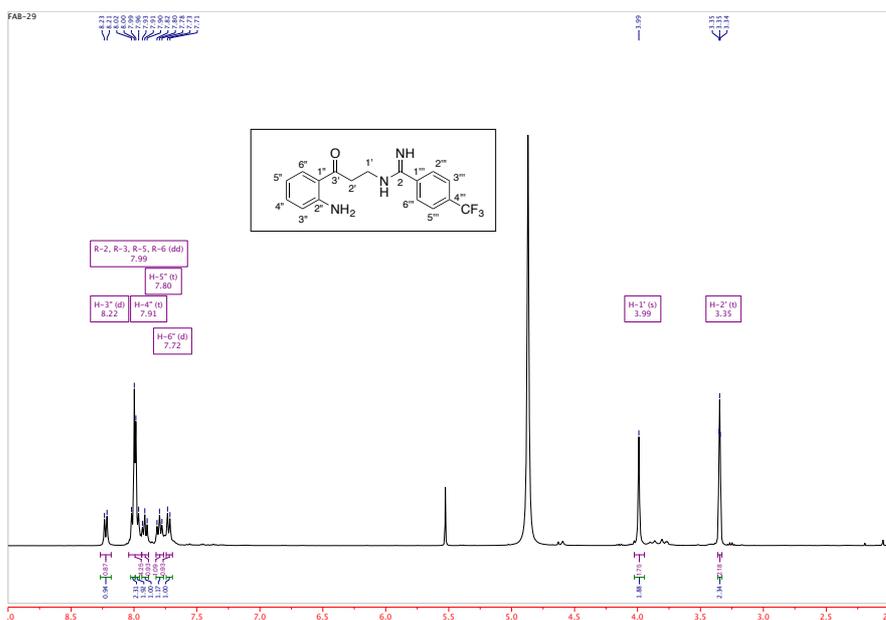
**N-(3-(2-Aminofenil)-3-oxopropil)acetimidamida (FAB-26)**



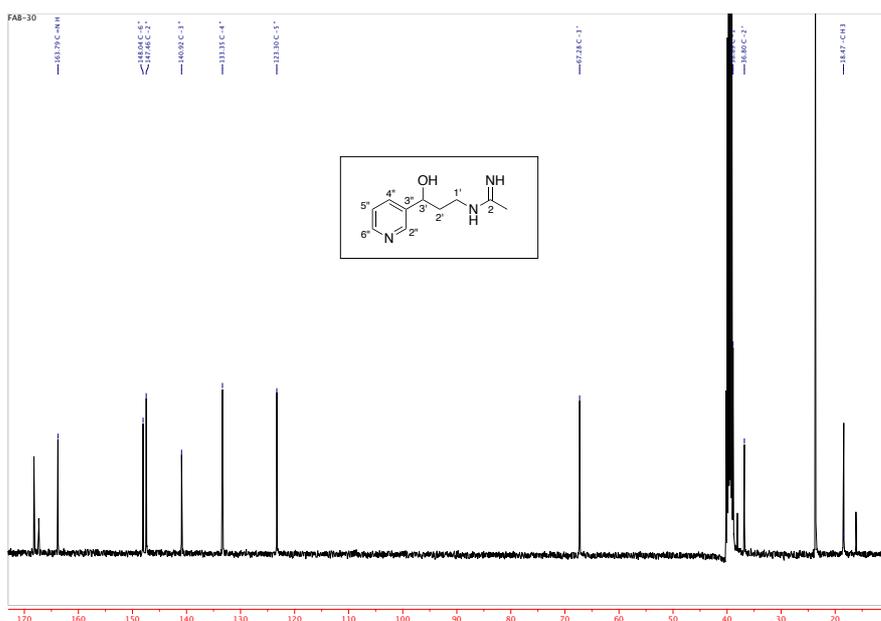
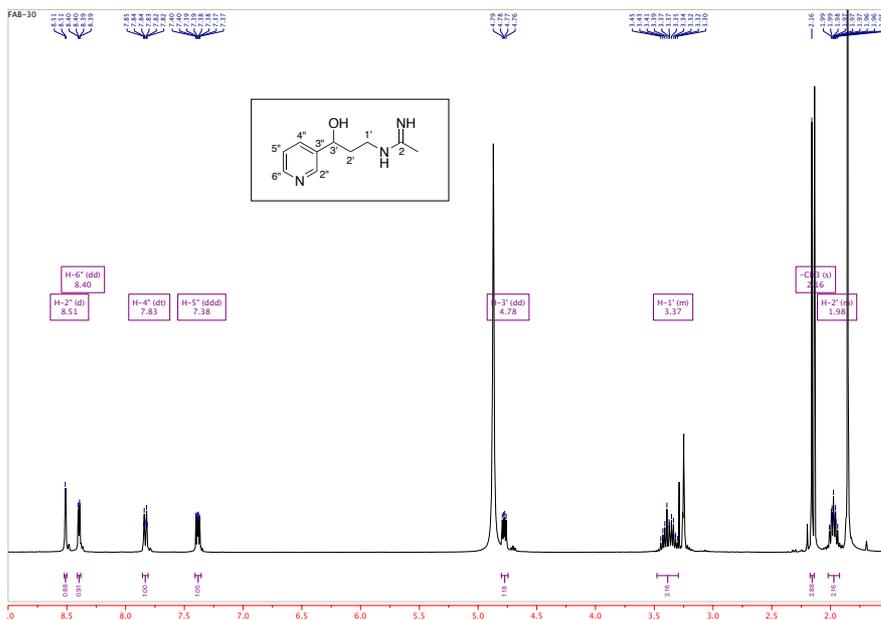




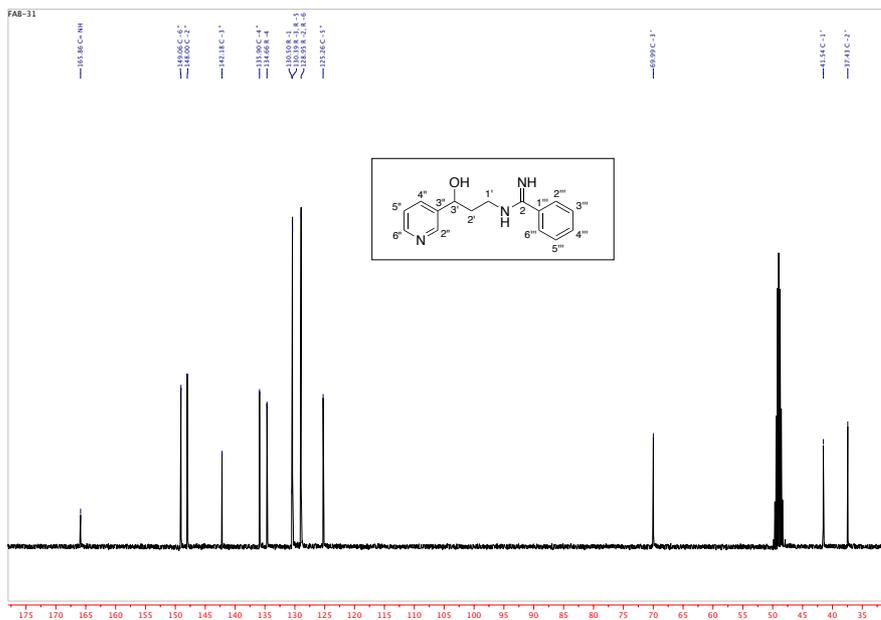
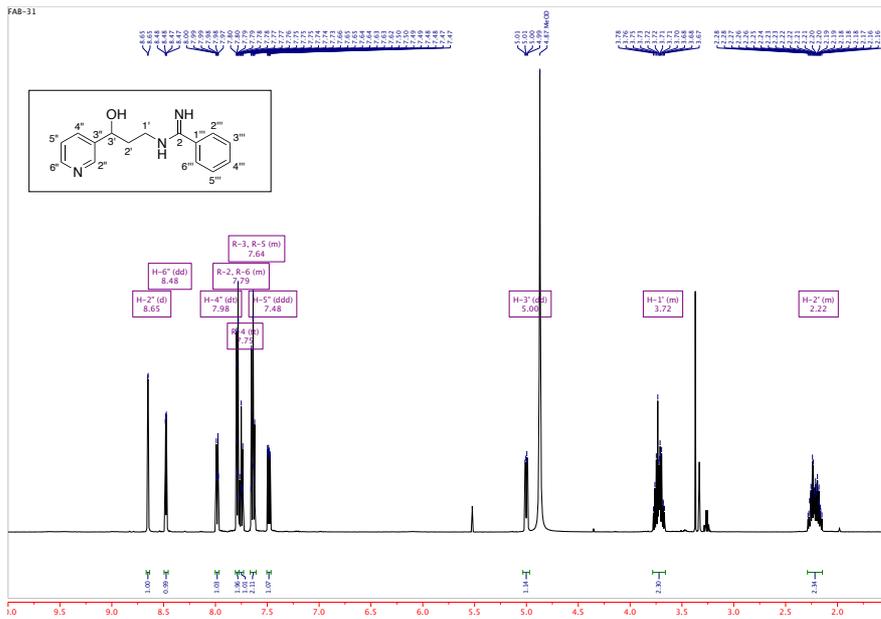
***N*-(3-(2-Aminofenil)-3-oxopropil)-4-(trifluorometil)benzimidamida (FAB-29)**



2. Familia D  
*N*-(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propilacetimidamida (FAB-30)

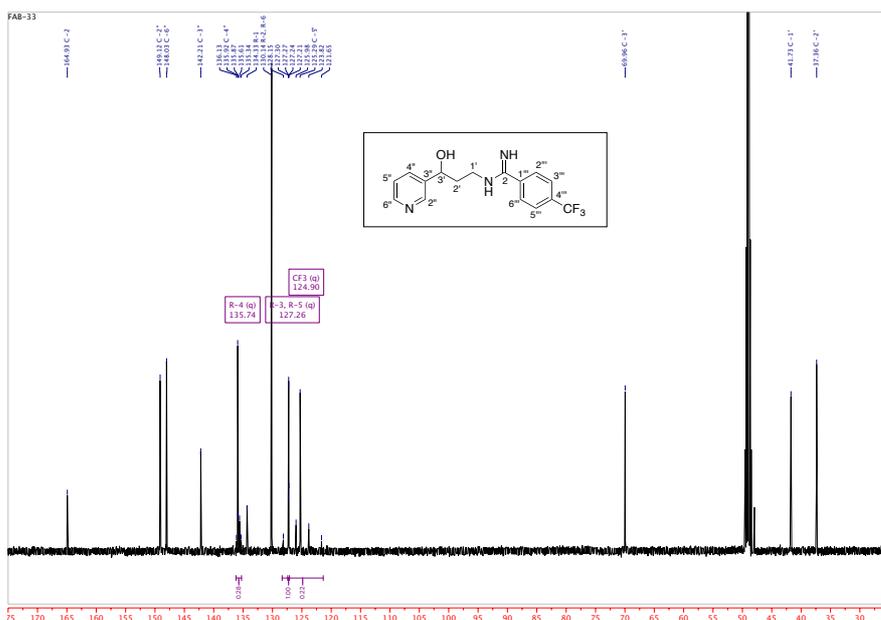
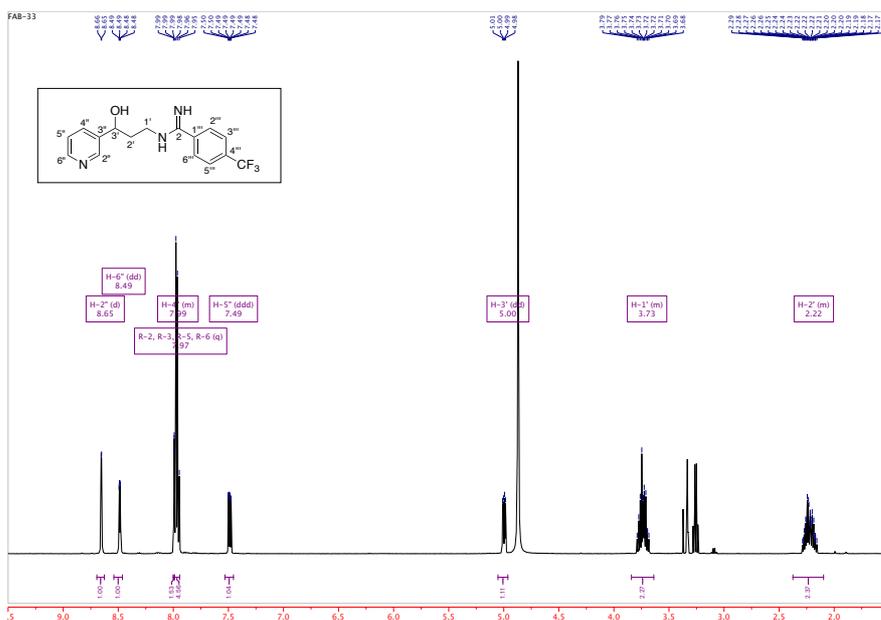


N-(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)benzimidamida (FAB-31)

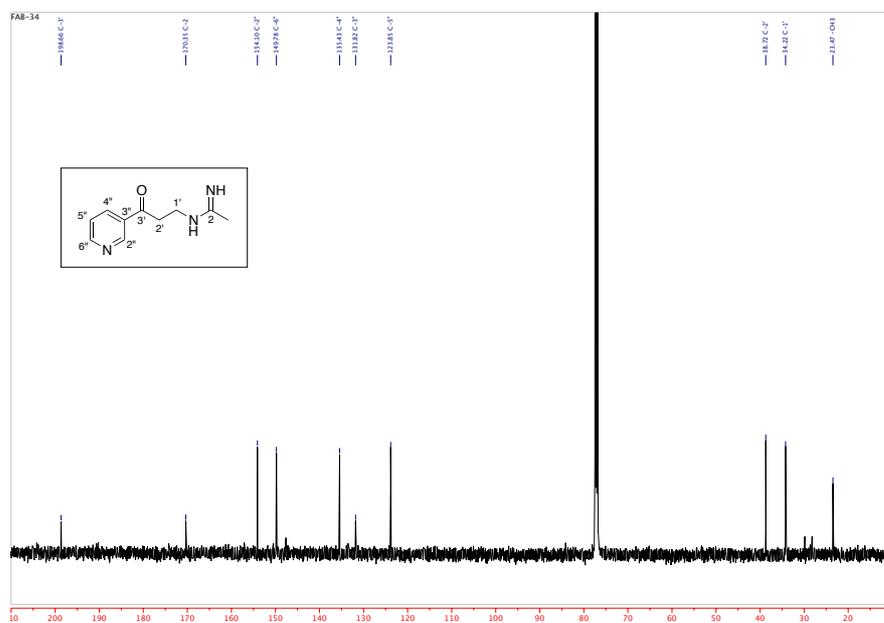
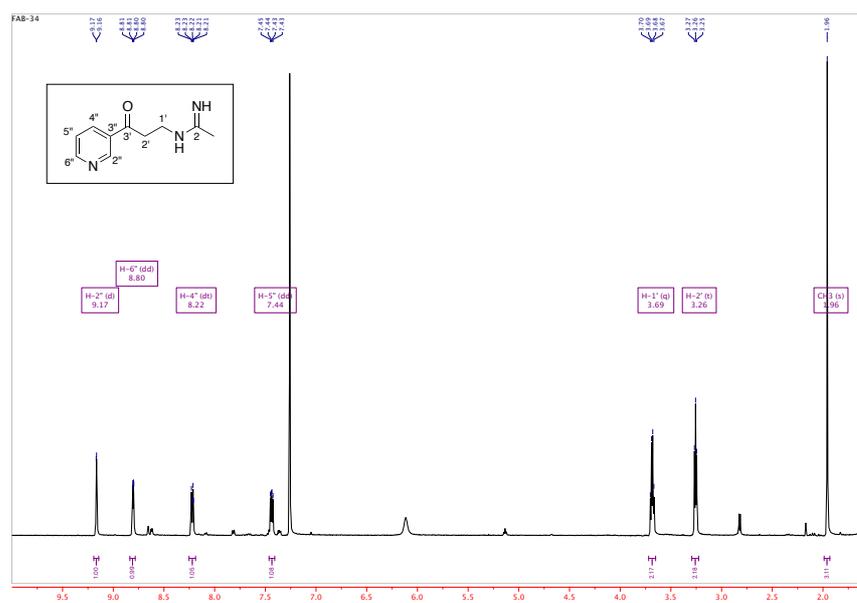




**N-(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)-4-(trifluorometil)propil)benzimidamida (FAB-33)**

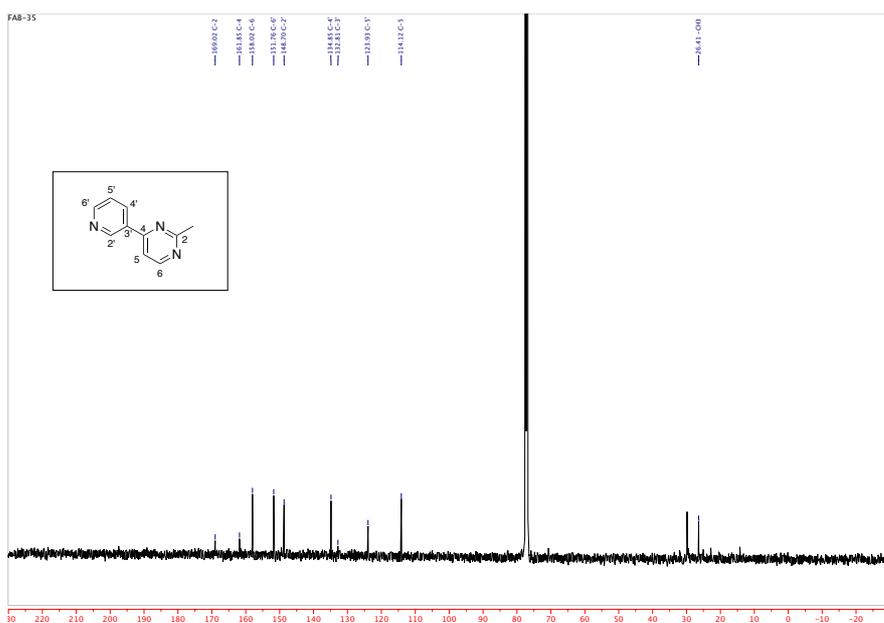
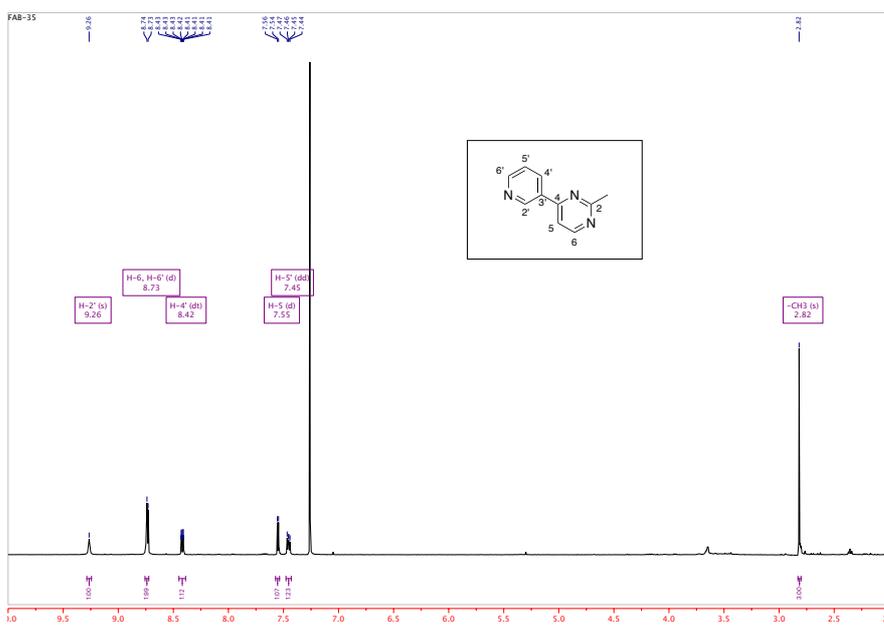


***N*-(3-Oxo-3-(piridin-3-il)propil)acetimidamida (FAB-34)**

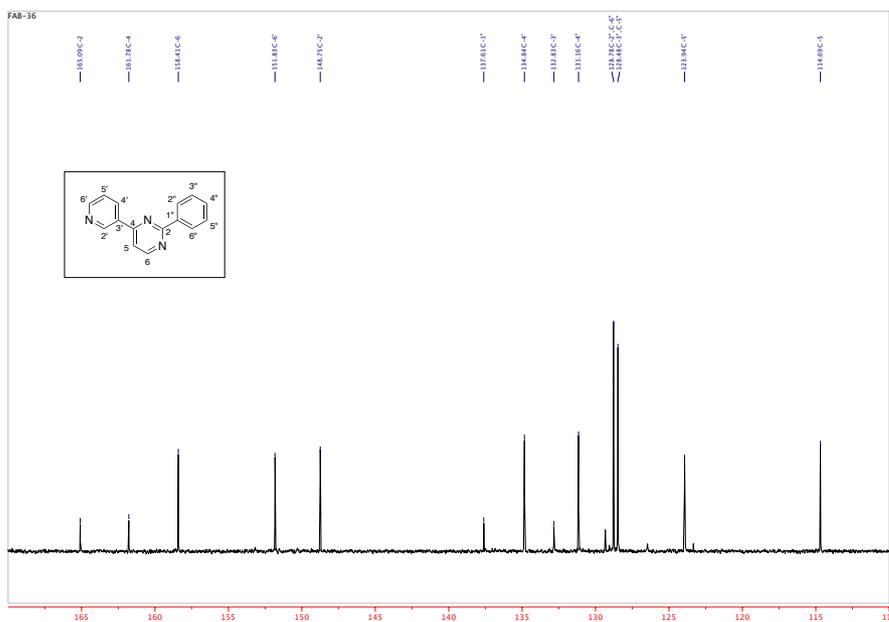
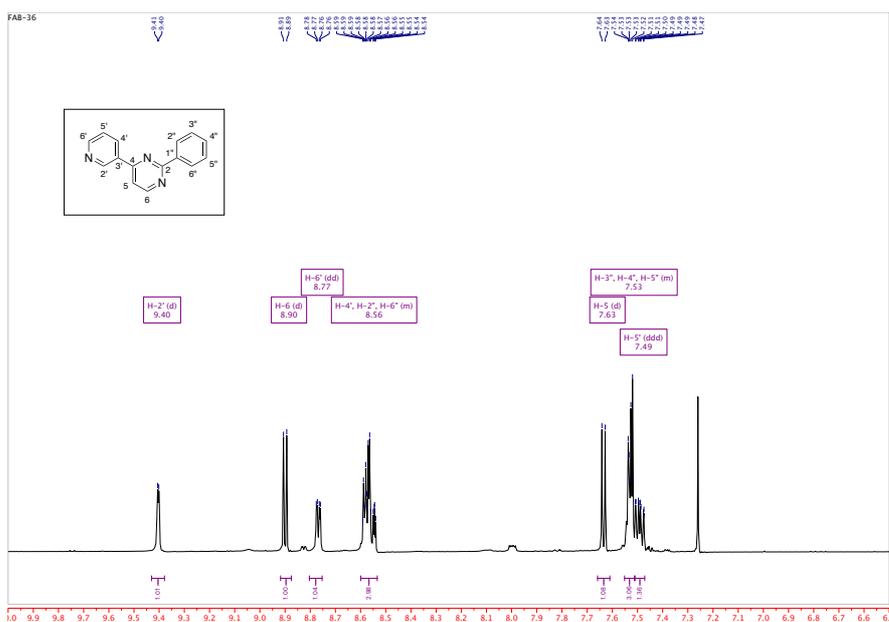


### 3. Familia E

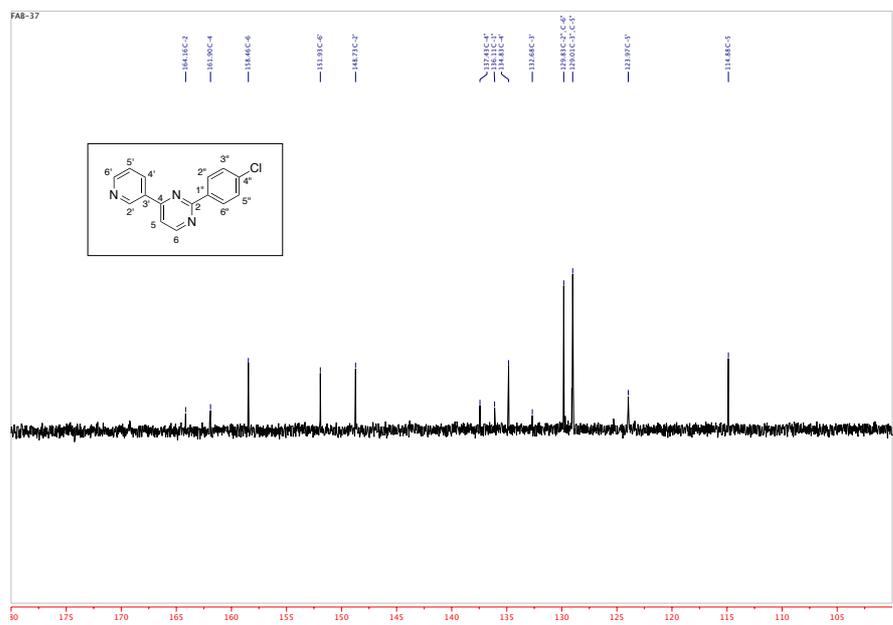
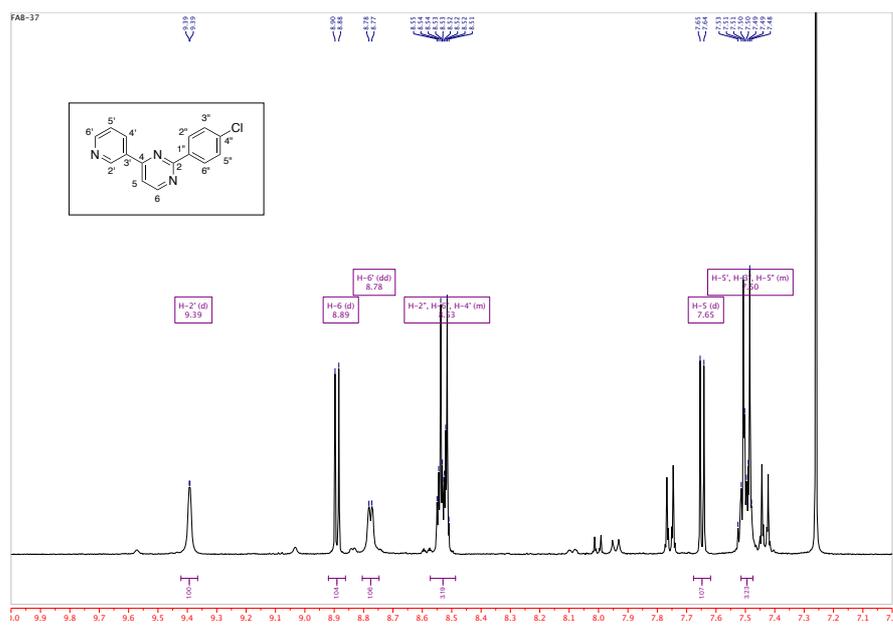
#### 2-Metil-4-(piridin-3-il)pirimidina (FAB-35)



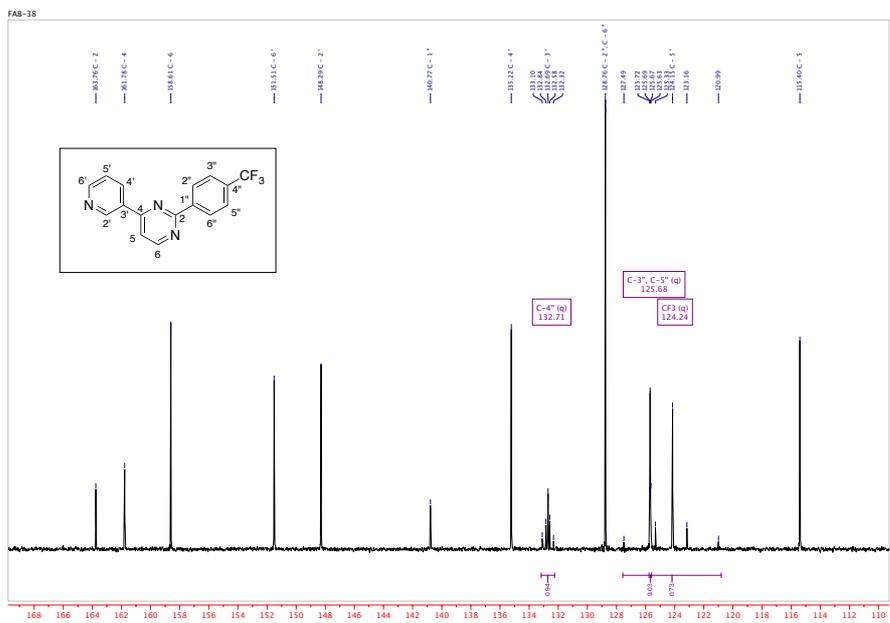
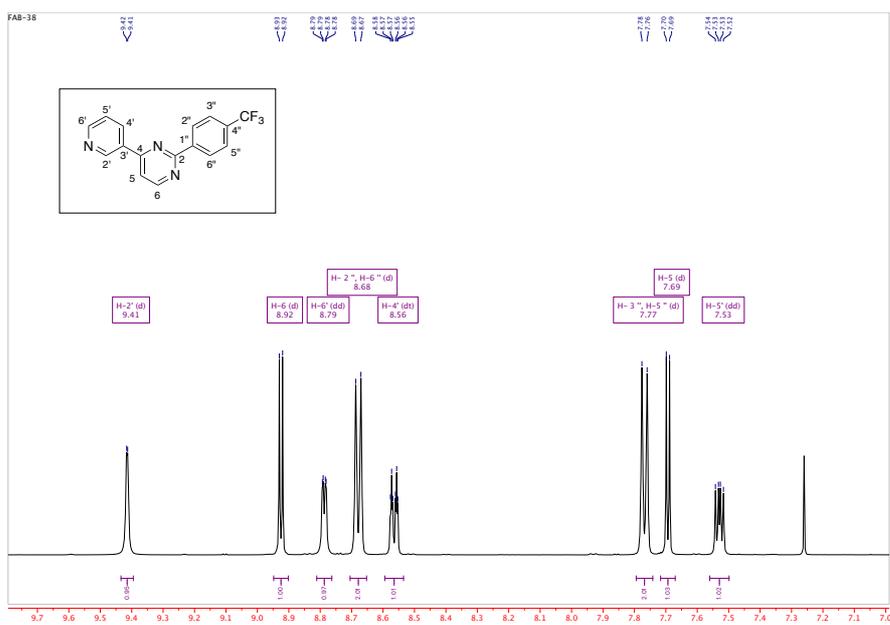
## 2-Fenil-4-(piridin-3-il)pirimidina (FAB-36)



## 2-(4-Clorofenil)-4-(piridin-3-il)pirimidina (FAB-37)

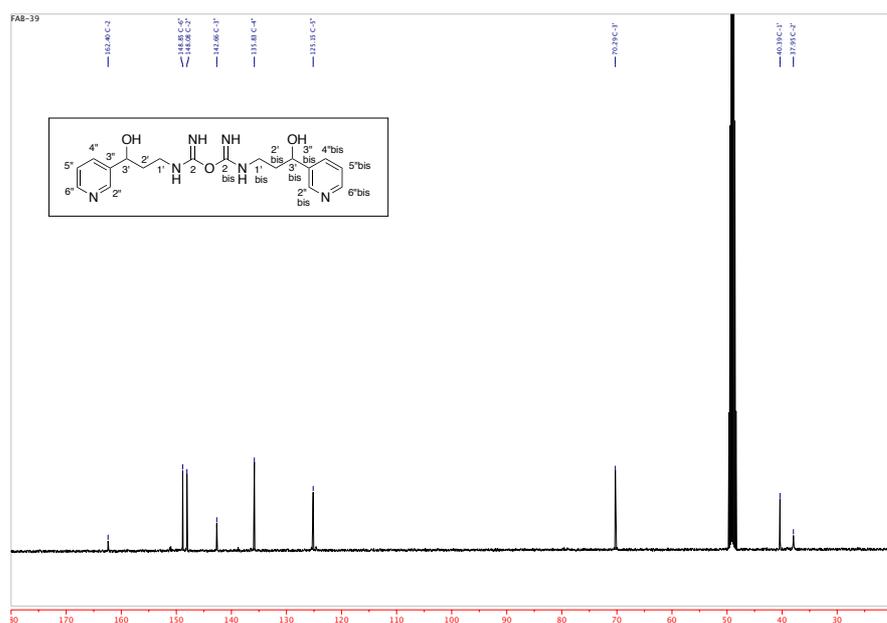
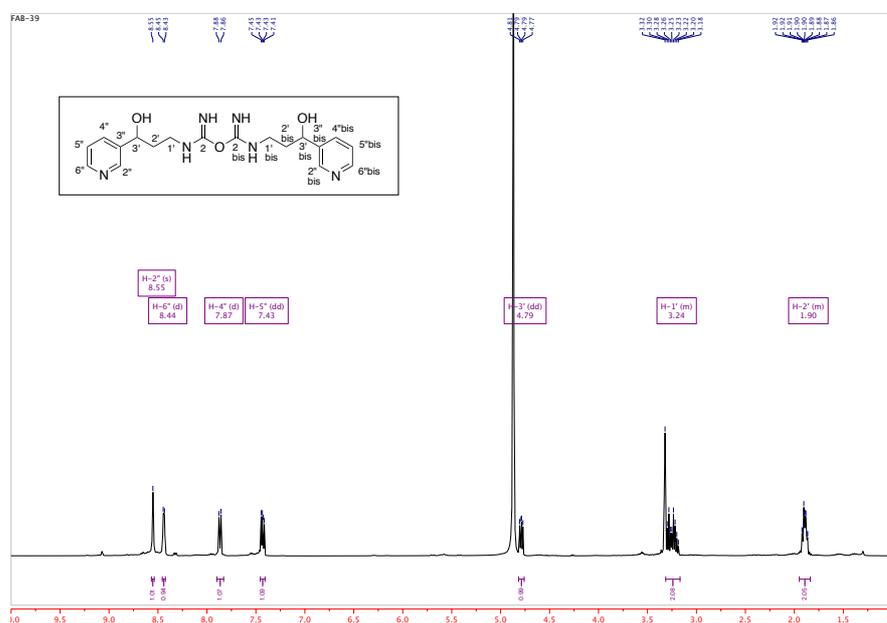


## 4-(Piridin-3-il)-2-(4-(trifluorometil)fenil)pirimidina (FAB-38)

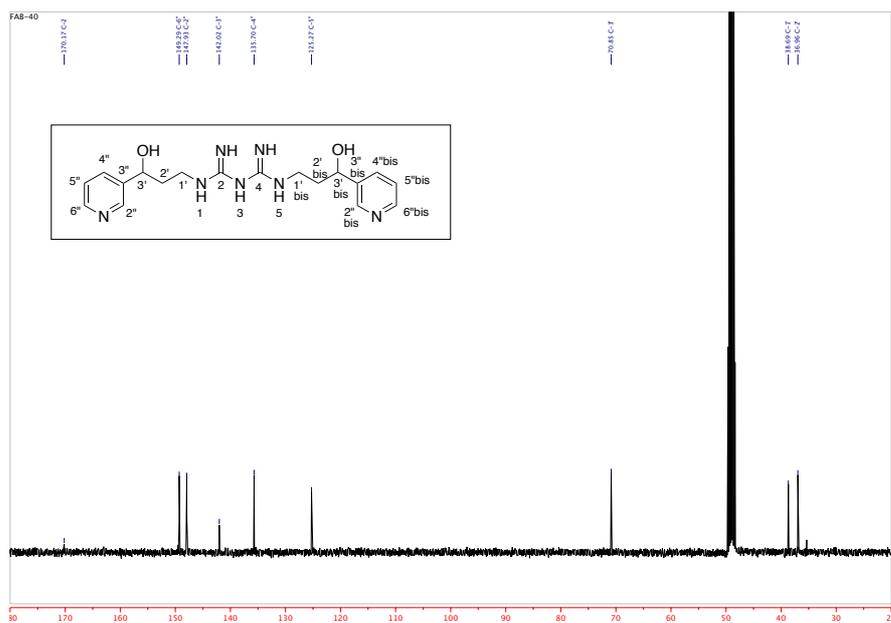
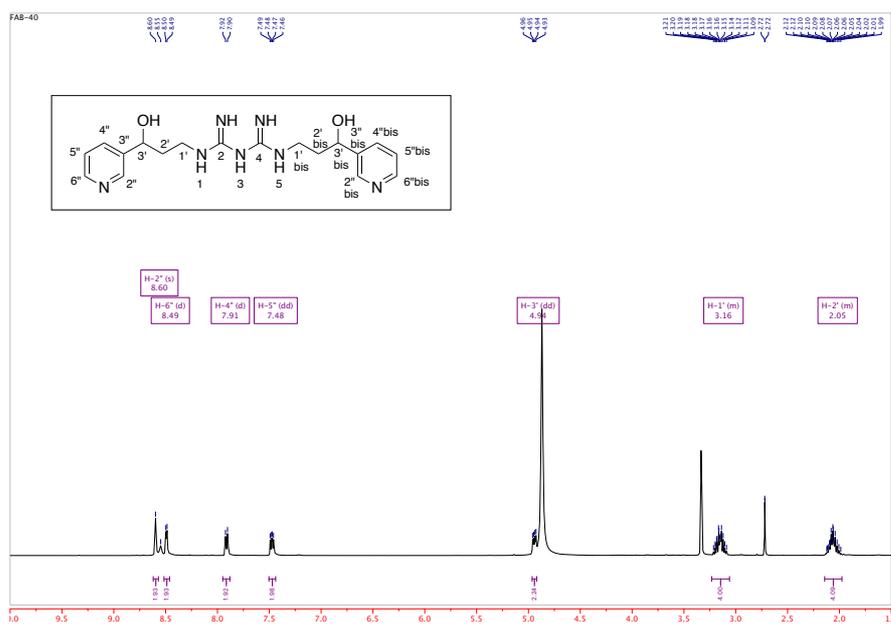


#### 4. Familia F

*N*-(3-Hidroxi-3-piridin-3-ilpropil)imidocarbamato de [(3-hidroxi-3-piridin-3-ilpropil)amino](imino)metilo (FAB-39)



# 1,5-bis(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)biguanidina (FAB-40)



# *N,N'*-bis(3-Hidroxi-3-(piridin-3-il)propil)guanidina (FAB-41)

