

**Trabajo final de Grado para la obtención del título en
Licenciatura en Bioquímica**

Título:

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN
LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE NUEVOS
DERIVADOS DE ISOQUINAS E
ISOTEBUQUINAS**

Bach. Francisco Javier Delgado Pelayo

Tutor: Dr. Angel H. Romero

Co-tutor: Dr. Diego Benítez

Montevideo, Uruguay 2025

Dedicatoria

Este trabajo final de grado y la culminación de la licenciatura está dedicada a mis abuelos Gladis Guedes, Artigas Pelayo, Ana Cabrera y Nelson Delgado por su apoyo y amor incondicional, sus enseñanzas de vida y hacer de mi la persona que soy. A ellos gracias y aquí un trabajo que es tan mío como de ellos.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia cercana, que supieron estar desde siempre tanto en los buenos como en los momentos más difíciles, entender las llegadas tarde a casa, el vernos poco y también saber festejar cada logro que me acercara más a recibirme como algo propio y con tanta fuerza que no quedaba más que seguir adelante con el doble de actitud que antes. A mi viejo Javier Delgado, quien con pocas palabras en momentos justos supo ayudarme como nadie. A mi madre Adriana Pelayo, que supo bajarme a tierra en los momentos donde más perdido me encontraba, haciéndome ver que luchar por mis sueños es tan valioso como hacerlos realidad. A mi hermano Diego Delgado que me enseñó el valor del libre albedrío y lo mágica y maravillosa que puede ser la vida si uno así lo quiere. A mi tía Rosana Delgado, que desde su experiencia supo darme el apoyo que necesité con la carrera y las presiones de la misma, haciéndome entender que, si a uno le apasiona lo que hace, todo es cuestión de tiempo. A mis abuelos, a quienes les dedico este trabajo, por ser siempre los pilares que me mantuvieron fuerte.

Nada de esto hubiese sido posible sin el Dr. Angel H. Romero, quien siendo mi tutor supo transformarse en mi amigo, enseñándome y preparándome para un mundo majestuoso que es la química, apoyándome y brindándome guía frente a las adversidades de la vida académica y desafíos tanto dentro como fuera del laboratorio. Agradecer también al Dr. Diego Benítez, quien me enseñó que la ciencia es un mundo lleno de posibilidades, y me hizo ver lo valioso que es la proyección personal y profesional a futuro, siempre buscando ser la mejor versión de nosotros.

Agradecer a todas las hermosas personas que esta carrera me hizo conocer, a mis compañeros de laboratorio Andrés Benítez, Martina Silvarrey, Pilar Terra, Ignacio González, Belén Dávila, Elena Aguilera, Marcos Couto, Hugo Cerecetto y en especial a Pablo Vignolo, con quien compartimos muchísimos momentos con las túnicas puestas y reactivos reaccionando, apoyándonos tanto en los momentos buenos como en los momentos difíciles, a él un especial agradecimiento.

A mi novia Abril González, que siendo amiga y luego algo más, supo estar y darme consejo cuando más lo necesite, siendo un apoyo incondicional, bajándome a tierra, haciéndome crecer y valorar lo valioso, comprendiéndome en cada momento difícil y ayudándome a superarlo. A ella gracias, gracias y mil gracias por hacer de mí una mejor persona cada día.

Agradecer a la Universidad de la República, Facultad de Ciencias y Facultad de Química por permitirme hallarme como profesional, encontrar mi pasión y formarme para una profesión hermosa llena de cosas por hacer.

A todos ustedes, ¡muchísimas gracias!

ÍNDICE

1. RESUMEN	pg. 7
2. INTRODUCCIÓN	pg. 10
2.1. Descripción de la enfermedad	
2.2. Situación actual de la leishmaniasis en el mundo, las Américas y el Uruguay	
2.3. Tratamiento de la leishmaniasis y avances en quimioterapia	
2.4. 4-Aminoquinolinas como agentes leishmanicidas	
2.5. Sistemas de isoquina e isotebuquinas y antecedentes como leishmanicida	
2.6. Importancia de la basicidad y lipofilicidad en el diseño de agentes leishmanicidas	
2.7. Justificación	
3. OBJETIVOS	pg. 29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	pg. 30
4.1 Química	pg. 30
4.1.1 Generalidades	
4.1.2 Procedimientos de síntesis química	
4.1.2.1 Síntesis de derivados deshidroxilados de isoquina	
4.1.2.1.1 Síntesis de intermedios de bencilaminos nitrados 2a-o (12 derivados)	
4.1.2.1.1.1 <i>Síntesis de los intermedios de N-(4-nitrobencil)dialquilamina 2a-c a partir de bromuro de 4-nitrobencilo 1</i>	
4.1.2.1.1.2 <i>Síntesis de los intermedios de N-(2-bromo-4-nitrobencil)dialquilamina 2d-f a partir de bromación de N-(4-nitrobencil)dialquilamina 2a-c</i>	
4.1.2.1.1.3 <i>Síntesis de los intermedios de N-(2-iodo-4-nitrobencil)dialquilamina 2g-i a partir de Filkenstein acoplamiento de N-(2-bromo-4-nitrobencil)dialquilamina 2d-f</i>	
4.1.2.1.1.4 <i>Síntesis de los intermedios de N-(2-flúoro-4-nitrobencil)dialquilamina 2j-l a partir de una secuencia de dos reacciones de 2-flúoro-4-nitrotolueno 1b</i>	
4.1.2.1.1.4.1 Síntesis de bromuro de 2-flúor-4-nitrobencilo 1c a partir de 2-flúor-4-nitrotolueno 1b	
4.1.2.1.1.4.2 Síntesis de N-(2-flúor-4-nitrobencil)dialquilamina 2j-l a partir de 1-(bromometil)-2-flúor-4-nitrobenzeno 1c	
4.1.2.1.1.5 <i>Síntesis de los intermedios de N-(2-cloro-4-nitrobencil)dialquilamina 2m-o a partir de una secuencia de dos reacciones de 2-cloro-4-aminotolueno 1d</i>	

- 4.1.2.1.1.5.1 Oxidación del grupo amino en el 2-cloro-4-aminotolueno **1d** para dar el 2-cloro-4-nitrotolueno **1e**
- 4.1.2.1.1.5.2 Preparación de derivados de bencil-amino **2m-o** y su análogo **2m'-o'** vía bromación bencílica
- 4.1.2.1.2 *Síntesis de intermedios de anilinas, 4-(dialquilaminometil)-2-substituted anilina **3a-o** a partir de la reducción de grupo nitro en las 4-(dialquilaminometil)anilina sustituidas*
- 4.1.2.1.3 Síntesis de 7-cloro-N-(4-(dialquilaminometil)fenil)quinolin-4-amina sustituidas **4a-h, 4k** y **4n** a partir de 4,7-dicloroquinolina y 4-(dialquilaminometil)anilina sustituidas **3a-o**
- 4.1.2.2 Síntesis de derivados deshdroxilados de isotebuquina**
- 4.1.2.2.1 Síntesis de derivados de 2-aril-4-nitrotolueno **6a-d** a partir de 2-bromo-4-nitrotolueno **5**
- 4.1.2.2.2 Síntesis de bromuro de 2-aril-4-nitrobencilos **7a-d** a partir de 2-aril-4-nitrotoluenos **6a-d**
- 4.1.2.2.3 Síntesis de 2-(dialquilaminometil)-5-nitrobifenilos **8a-k** a partir de 2-(bromometil)-5-nitrobifenilos **7a-d**
- 4.1.2.2.4 Reducción de derivados de 2-(dialquilaminometil)-5-nitro-bifenilos **8a-k** para dar los correspondientes intermedios de anilina **9a-k**
- 4.1.2.2.5 Síntesis de derivados de 7-cloro-N-(6-(dialquilamino)metil)bifenil-3-il)quinolin-4-amina **10a-k**

4.1.2.3 Síntesis de compuestos controles

4.2 Biología pg. 66

4.2.1 Cribado de compuestos en macrófagos humanos infectados con una línea bioluminiscente de *Leishmania infantum* pg. 66

- 4.2.1.1 Cultivo de parásitos, línea bioluminiscente de *Leishmania infantum*
- 4.2.1.2 Cultivo de la línea celular monocítica
- 4.2.1.3 Conteo de células
- 4.2.1.4 Preparación de fármacos y compuestos
- 4.2.1.5 Ensayo de cribado
- 4.2.1.6 Lectura de viabilidad parasitaria por bioluminiscencia
- 4.2.1.7 Lectura por microscopía para evaluar densidad celular y confirmación de compuestos activos
- 4.2.1.8 Parámetros de calidad y validación del ensayo

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Química pg. 72

5.1.1 Síntesis de los derivados deshidroxilados de isoquina

5.1.2 Síntesis de los derivados deshidroxilados de isotebuquina

5.2. **Actividad biológica** pg. 79

6. **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS** pg. 87

7. **FINANCIAMIENTO** pg. 88

8. **BIBLIOGRAFÍA** pg. 88

1. RESUMEN

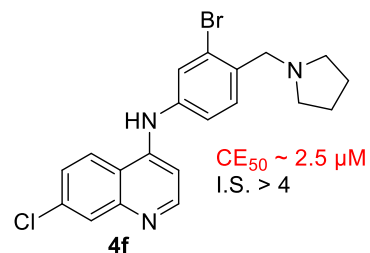
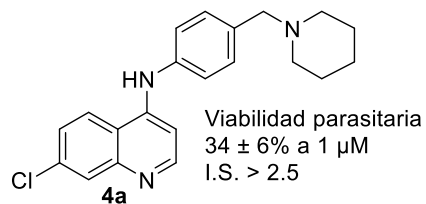
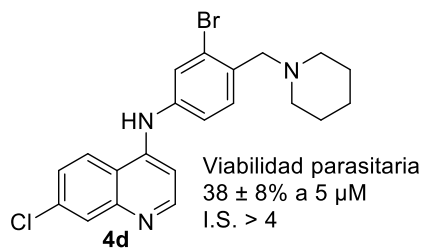
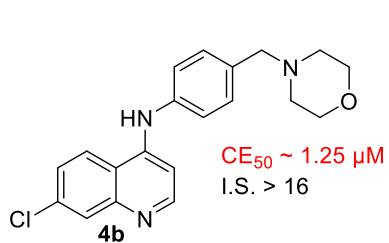
La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que afecta a millones de personas en el mundo. Para humanos no existen vacunas y los tratamientos actuales son netamente quimioterapéuticos, los cuales presentan limitaciones asociadas a toxicidad, baja eficiencia, desarrollo de resistencia parasitaria, altos costos y regímenes de medicación complejos. Esto hace necesario el descubrimiento de nuevas plataformas químicas potentes y selectivas para el desarrollo de agentes leishmanicidas. En ese sentido, los derivados de quinolinas, en particular, las 4-aminoquinolinas, representan una conveniente plataforma para el desarrollo de agentes leishmanicidas por su potencial para generar agentes potentes y selectivos con un mecanismo dirigido a afectar al parásito y ser capaz de inducir activación inmunológica en macrófagos. Inspirados en el sistema de 4-aminoquinolinas y en el potencial de una serie de derivados deshidroxilados de isoquina e isotebuquina previamente explorado por el grupo, en la presente investigación se planteó el diseño, síntesis química y evaluación leishmanicida *in vitro* de una serie de derivados deshidroxilados de isoquina e isotebuquina, que buscan optimizar las estructuras previas en busca de la identificación de nuevos *hits*. Los nuevos derivados conservan algunos grupos esenciales en la actividad biológica, tales como grupo dialquilamino terminal de pirrolidino, morfolino y piperidina, y algunas variables estructurales fueron introducidas para modular la basicidad y lipofilicidad. En total, 25 derivados de 4-aminoquinolinas fueron preparados y debidamente caracterizados, divididos en la serie de: i) isoquina (8 derivados, 5 nuevos), ii) isotebuquina (11 nuevos derivados) y iii) compuestos controles (6 nuevos derivados), que buscan evaluar la relevancia del grupo amino terciario terminal en la actividad leishmanicida. La actividad leishmanicida fue evaluada frente a un modelo de macrófagos humanos infectados con *Leishmania infantum*. De la serie de isoquina, fueron identificados los derivados **4b**, **4d** y **4f**, exhibiendo valores de CE_{50} (Concentración Efectiva 50) menores a 5 μM e Índice de Selectividad > 4 . También se destaca el derivado **4a** que presentó un valor de $CE_{50} < 1 \mu M$, Índice de Selectividad > 2.5 . Con relación a la serie isotebuquina, fueron identificados como compuestos promisorios los derivados **10b** y **10j** que presentaron CE_{50} menores a 10 μM e índices de selectividad > 2 , los derivados **10a**, **10c** y **10f** con valores de $CE_{50} \sim 1.25 \mu M$ e Índice de Selectividad > 4 . Es importante mencionar que la actividad leishmanicida de estos compuestos es igual o superior que la determinada para el fármaco de referencia miltefosina ($CE_{50} \sim 5 \mu M$, Índice de Selectividad > 4).

Estos compuestos no sólo son promisorios por su perfil de bioactividad sino porque presentan parámetros fisicoquímicos ($\text{Log } P$ y constantes de ionización, pK_a) apropiados para garantizar su acumulación en el fagolisosoma que es el sitio en el macrófago donde se aloja el parásito en su forma intracelular. Finalmente, se realizó un estudio estructura actividad cualitativo, junto a compuestos control que evidenciaron la importancia de ciertas funcionalidades básicas y lipofílicas para modular la actividad y selectividad y optimizar el potencial de los derivados isoquina e isotebuquina como plataforma conveniente para el desarrollo de agentes leishmanicidas y mayores estudios son necesarios para dilucidar el potencial de alguno de estos compuestos como agente leishmanicida contra la leishmaniasis visceral.

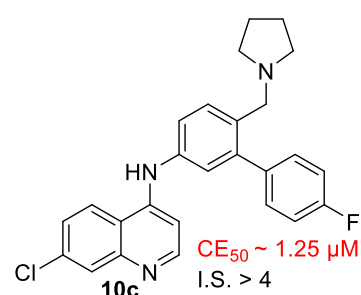
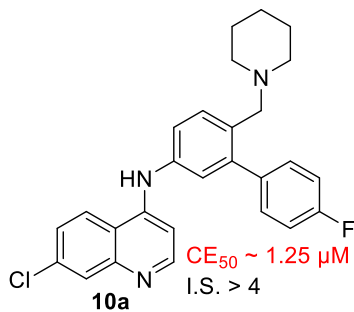
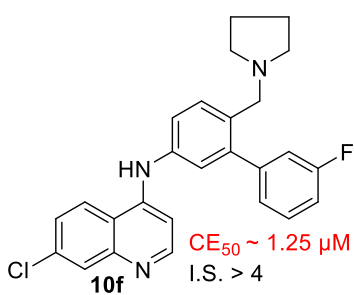
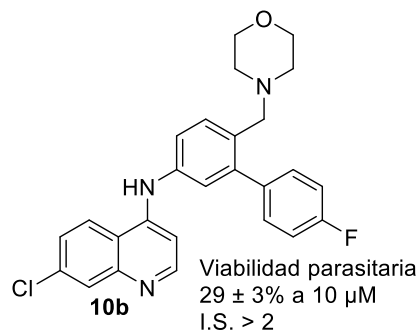
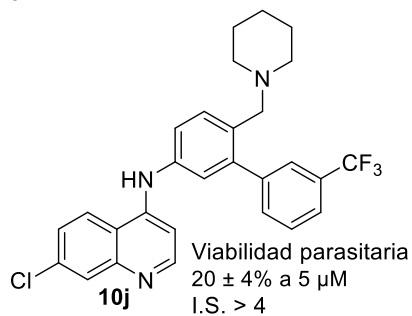
Palabras clave: *Leishmania, Leishmanicida, 4-aminoquinolinas, Isoquina, Isotebuquina*

Compuestos más promisorios descubiertos en este trabajo

Serie isoquina



Serie isotebuquina



2. INTRODUCCIÓN

2.1. Descripción de la enfermedad

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida que se encuentra clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las más relevantes por su impacto y persistencia. Esta enfermedad es producida por protozoarios tripanosomátidos del género *Leishmania* y es transmitida al hombre por la picadura de insectos hematófagos femeninos de la subfamilia *Phlebotominae*, género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* ^[1]. El ciclo de vida del parásito inicia con su estadio promastigote en el intestino del mosquito, el cual se diferencia al promastigote metacíclico ^[1,2]. Posteriormente, al momento de la picadura, el parásito es transmitido al humano bajo el estadio de promastigote metacíclico ^[2]. Esta forma del parásito es fagocitada por células del sistema fagocítico mononuclear, principalmente los macrófagos y dentro del mismo inicia su cambio al **estadio amastigote intracelular (forma clínicamente relevante)**, el cual está adaptado a las condiciones extremas dentro del fagolisosoma tales como *pH* ácido y alta actividad proteolítica ^[2]. Una vez adaptado a las condiciones lisosómicas, los amastigotes inician su reproducción asexual hasta colapsar el macrófago e iniciar la invasión a otros macrófagos vecinos. Esto último conlleva al proceso de infección e inflamación típicas de la leishmaniasis. Posteriormente, cuando los amastigotes son ingeridos por el insecto, desde su huésped mamífero, se diferencian a promastigote, para así completar su ciclo de vida ^[1,2]. **(Figura 1)**. Estos aspectos de la biología del parásito y la fisiopatología de la enfermedad son claves al momento de diseñar agentes leishmanicidas, tal como será descrito en la sección 2.4.

Existen más de 20 especies de *Leishmania* responsables de causar infección en humanos y dependiendo de la especie se puede generar las distintas manifestaciones clínicas: (i) leishmaniasis cutánea (LC), (ii) leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) ^[1,2,3a]. La primera es la forma más frecuente de la enfermedad y es caracterizada por aparición de lesiones cutáneas de carácter ulcerosas distribuidas por diversas zonas del cuerpo, mientras la leishmaniasis mucocutánea se presenta como una remarcable destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta. La leishmaniasis visceral se manifiesta como una inflamación de la zona abdominal derivado de la infección e inflamación del bazo y el hígado, caracterizado por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. En términos generales, las especies de parásitos de *Leishmania* más comunes de infección en

humanos tenemos a la *L. braziliensis* (LC y LMC en América), *L. major* (LC en Asia, África, región mediterránea), *L. infantum* (América, región mediterránea) y *L. donovani* (Asia, África) como responsables de LV.

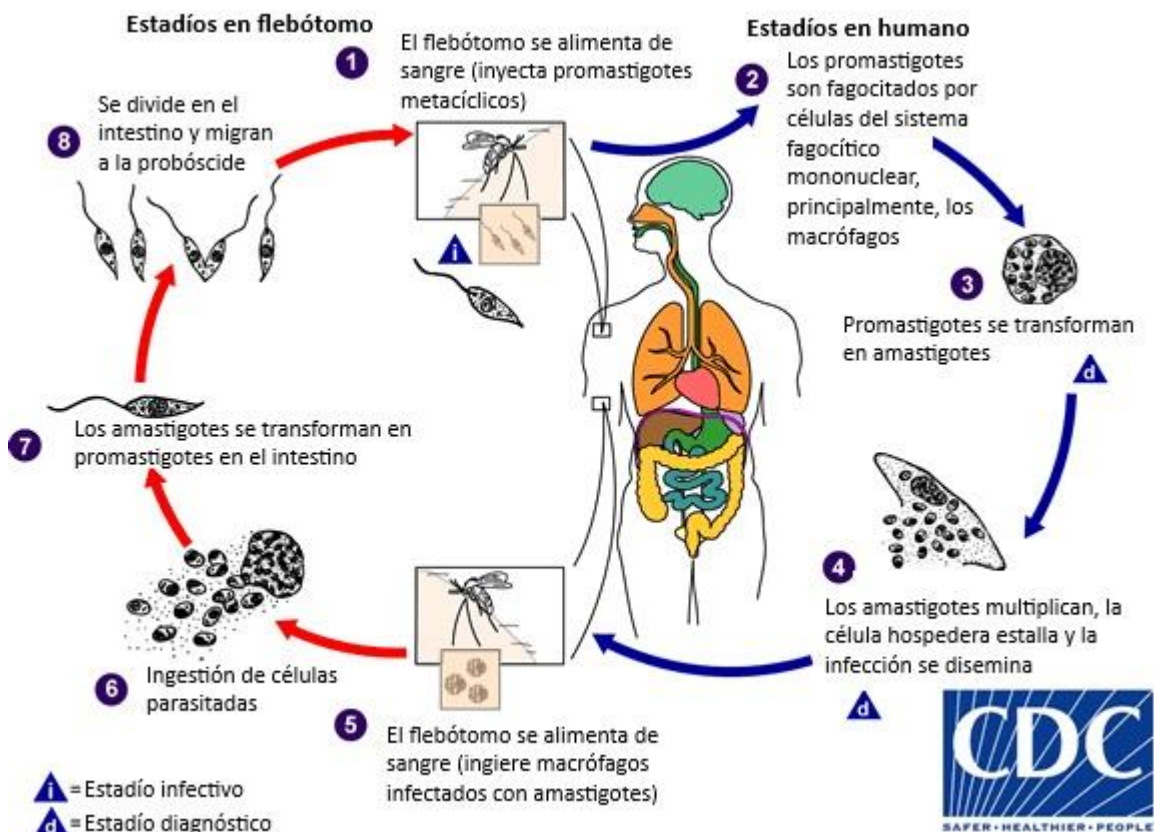


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Leishmania*. Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Modificado y traducido al idioma español.

2.2. Situación actual de la leishmaniasis en el mundo, las Américas y el Uruguay

La leishmaniasis representa un problema sanitario en regiones tropicales y subtropicales de África, Asia, Latino-América y la región Mediterránea (**Figura 2a**)^[3,4]. De acuerdo a la OMS, esta enfermedad es endémica en 98 países con un estimado de 350 millones en riesgo. Anualmente, se estima una incidencia de 1.3 millón de nuevos casos de leishmaniasis y de 65.000 defunciones. La mayoría de los nuevos casos están asociados a LC, con entre 600.000 y 1 millón de nuevos casos anuales y se concentran en un 95% en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. Por su parte, la LV, que es la forma más mortal siendo responsable de más de 90% de muertes por leishmaniasis y fatal en un 95% de los casos no tratados, registra entre

50.000 y 90.000 nuevos casos anuales, los cuales se concentran en Brasil, la India y el este de África. Mientras la LMC, que presenta una menor incidencia de las dos anteriores, está fundamentalmente presente en un 90% en Brasil, Bolivia, Perú y Etiopía [3a].

En las Américas, la leishmaniasis es endémica en 19 países registrando un estimado de 58.000 de casos anuales con una letalidad media del 7%, de los cuales unos 52.645 corresponden a LC y LMC y el resto corresponden a LV (**Figura 2b**) [3b]. La mayor incidencia deriva de países como Brasil, Bolivia, Perú, Colombia, Panamá, Nicaragua, El Salvador, Honduras, Paraguay, Guyana, Surinam, Venezuela, Guatemala, Costa Rica, Ecuador, México y discretamente Argentina. Baja incidencia con escasísimos casos (menos de 10) se puede encontrar en Chile y en el Uruguay.

Para el Uruguay, que, aunque presenta una nula o baja incidencia, desde el año 2019 se han venido reportando en promedio un nuevo caso de LV por año, [5] lo cual se estima se incrementen por la persistencia existencia de un creciente número de casos autóctonos de LV canina (LVC) en ciertas zonas de la región litoral-norte desde 2015 [5] y la presencia del vector de la LV, la *Lutzomyia longipalpis*, en los departamentos de Salto y Artigas [5]. Estos hechos en combinación con la cercanía geográfica con Brasil, que concentra un 95% de los casos de leishmaniasis en América, [3,4] suponen que la leishmaniasis representa un riesgo para la población local, resultando la búsqueda de alternativas terapéuticas contra esta enfermedad un tema de relevancia sanitaria pública.

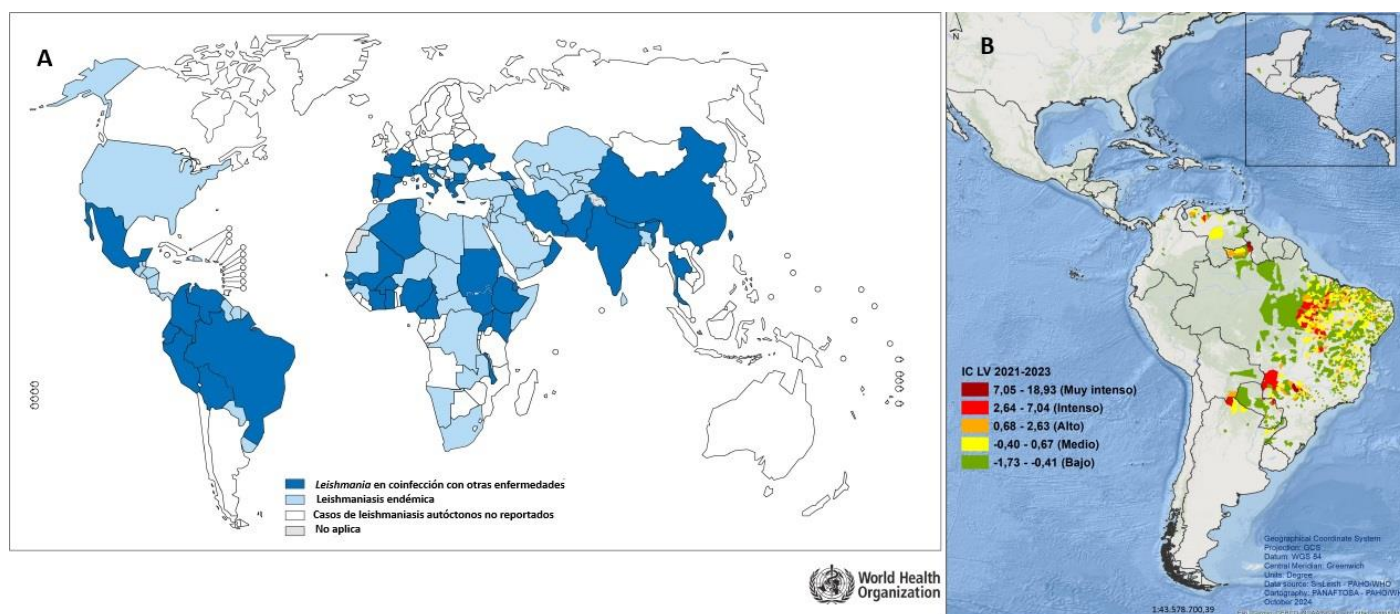


Figura 2. Mapas de distribución mundial de la leishmaniasis **A** (Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581526/figure/ch3.fig1/>). Modificado y traducido al

idioma español) y de la leishmaniasis visceral en América **B** (IC LV, índice compuesto de leishmaniasis visceral, representado por la media de casos y la incidencia por 100 mil habitantes en el trienio 2019-2021) ^[3b].

2.3. Tratamiento de la leishmaniasis y avances en quimioterapia

Una de las grandes problemáticas en torno a la leishmaniasis es la ausencia de vacunas y agentes terapéuticos efectivos. Hasta el momento, existen una serie de fármacos aprobados para su uso clínico tales como agentes antimoniales (Sb^V) de Glucantime® y Pentostam® y otros agentes químicos tales como pentamidina, anfotericina B y miltefosina (**Figura 3**) ^[6,7]. Los agentes antimoniales han sido utilizados tradicionalmente desde 1940 para el tratamiento de leishmaniasis bajo sus diferentes formas, aunque estos compuestos no han sido aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)* ^[7]. Por su parte, la anfotericina B que se encuentra bajo una formulación liposomal (AmBisome®) ha sido aprobado por la *FDA* para el tratamiento de LV, siendo administrado por infusión intravenosa ^[7]. En 2014, la *FDA* aprobó el uso de miltefosina para el tratamiento de LC, LMC y LV para personas mayores de 12 años con un peso superior a los 30 Kg ^[7]. Otros casos como pentamidina y paromomicina son utilizados para el tratamiento en diversas regiones, aunque no han sido aprobados por la *FDA* para el tratamiento de leishmaniasis.

Los antimoniales pentavalentes presentan problemas de toxicidad severa como cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, pancreatitis y hepatotoxicidad. Por su parte, la anfotericina B en su formulación desoxicolato tiene como efectos adversos nefrotoxicidad severa, tromboflebitis e hipocalcemia. Si bien esta toxicidad reduce en su formulación liposomal, presenta alto costo ^[6]. La miltefosina presenta un riesgo para las embarazadas por ser teratogénica, además de efectos adversos hepatotóxicos y nefrotóxicos ^[6]. La paramomicina tiene problemas de ototoxicidad, neurotoxicidad y hepatotoxicidad, y junto a la pentamidina que presenta efectos adversos como hiperglucemia, miocarditis, hipotensión y taquicardia, son drogas con eficacia muy variable en la región donde se realizan los tratamientos ^[6]. En general, los tratamientos actuales presentan problemas de alta toxicidad, costos elevados, administración compleja, resistencia emergente y eficacia variable según la región y especie de *Leishmania* ^[6].

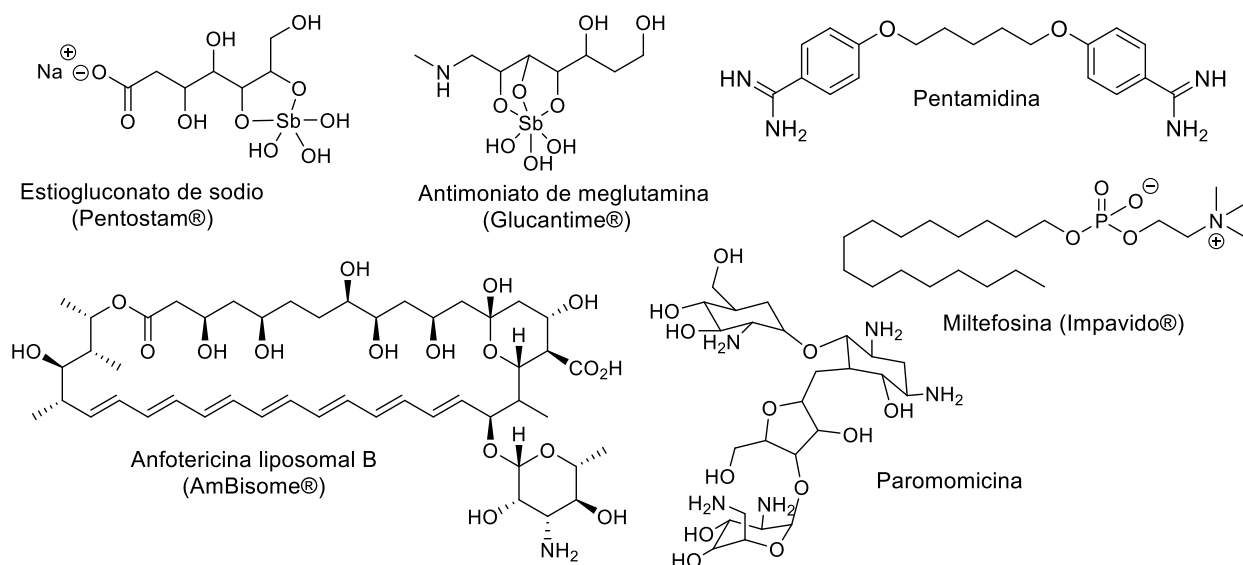
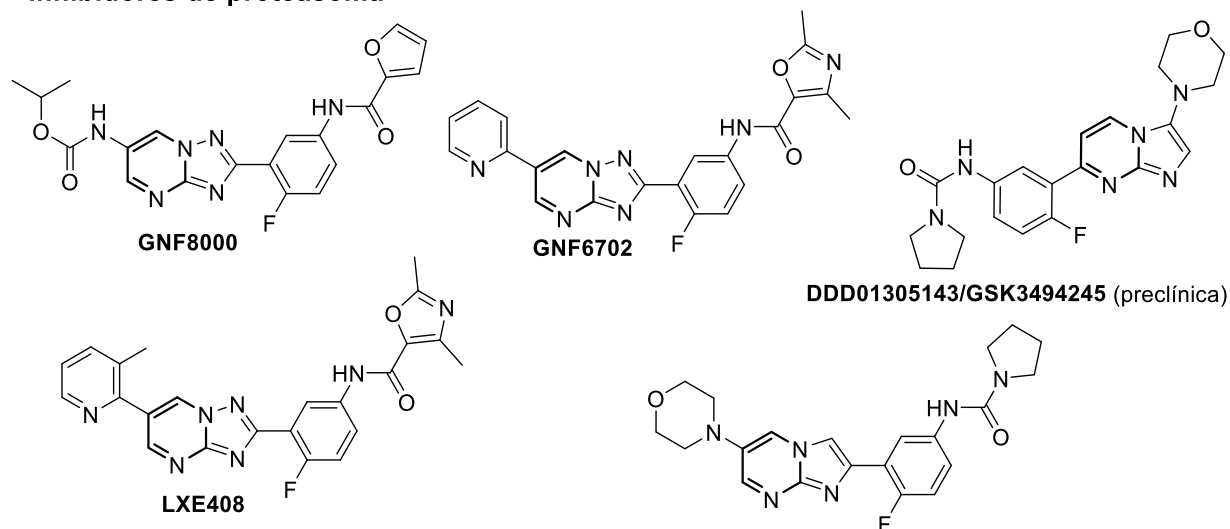


Figura 3. Fármacos de referencia para el tratamiento de la leishmaniasis.

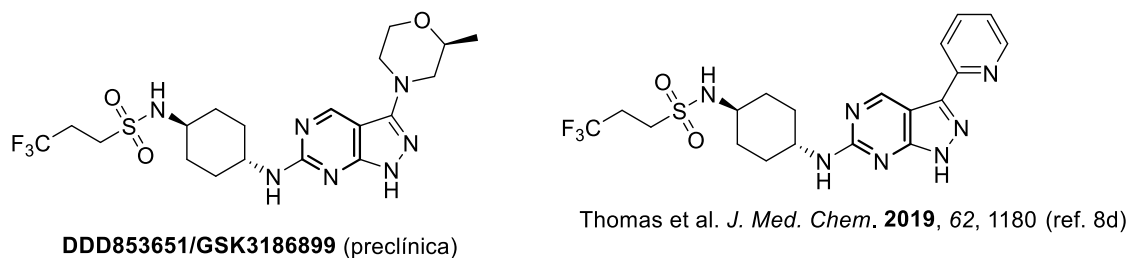
En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, diversos entes no gubernamentales tales como la *Drug for Neglected Disease Innovative (DNDi)*, agencias/consorcios europeas y asiáticas han realizado grandes inversiones en las últimas dos décadas, lo cual ha permitido la identificación de nuevos agentes leishmanicidas potenciales que actualmente se encuentra en fase de investigación de optimización química del líder y otros en fase preclínica avanzada o clínica. A continuación se muestran algunas agentes leishmanicida que formaron parte del portafolio de 2023 y que representan plataformas para plantear nuestros diseños, destacando: (i) inhibidores de proteasoma tales como GNF8000, GNF6702, LXE408 y DDD01305143/GSK3494245 89 (fase preclínica en 2023); (ii) inhibidores de quinasa dependiente de ciclina-12 (*CDK-12*) tales como DDD853651/GSK3186899 (fase preclínica en 2023); (iii) compuestos de nitroimidazol tales como DNDi-VL2098, DNDi-VL2075, DNDi-VL8219 y DNDi-VL0690 (fase preclínica en 2023), (iv) benzoxaboroles tales como DNDi-92 VL6148 (fase clínica en 2023) y, DNDi-5421 y DNDi-5640 (fase preclínica en 2023) y finalmente, (v) amino-pirroles tales como DNDi-5561, DNDi-1047 and DNDi-1044 (fase preclínica en 2023) ^[8]. Otros sistemas heterocíclicos han sido identificados por el grupo de Ian Hilbert que se encuentra en fase preclínica (**Figura 4**) ^[8c].

Inhibidores de proteasoma

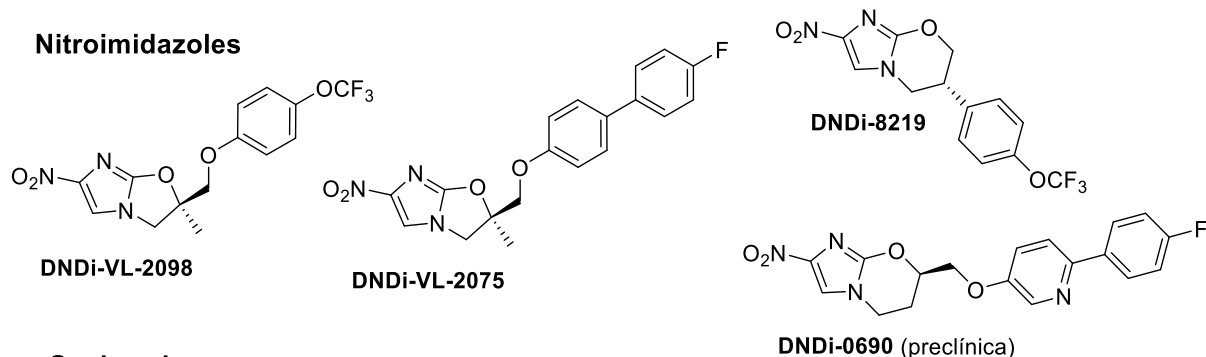


Thomas et al. *J. Med. Chem.* **2021**, 64, 5905 (ref. 8c)

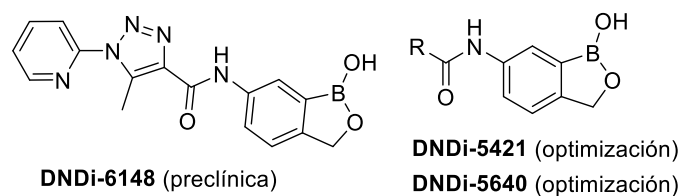
Inhibidores de quinasa dependiente de ciclina CDK-12



Nitroimidazoles



Oxaboroles



Aminopiroles

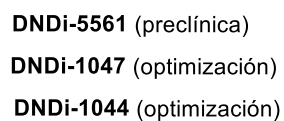


Figura 4. Estructuras de moléculas con actividad leishmanicidas en estudios de optimización química del líder, estudios pre-clínicos avanzados o clínicos [8].

A pesar de las inversiones y descubrimiento de nuevas estructuras químicas potenciales, debido a las altas exigencias farmacológicas, la tasa de éxito en el descubrimiento de fármacos es muy baja, identificándose solamente 20 candidatos en fase de optimización o en fase preclínica de los 4.200.000 compuestos probados ^[8]. Esto obliga a plantear nuevas estrategias más certeras y efectivas para abordar la complejidad de esta enfermedad que vayan más allá de los conceptos clásicos de la química medicinal para el diseño de nuevos agentes leishmanicidas potentes, selectivos y seguros, las cuales deben tener significativos efectos sobre el parásito con discretos efectos tóxicos sobre la célula huésped. En ese sentido, como recientemente reflejamos en una revisión, ^[9a] la plataforma de 4-aminoquinolina es altamente conveniente para el diseño de agentes leishmanicidas potentes y selectivos, la cual funcionalizada con grupos básicos de dialquilamina y grupos lipofílicos parecen ser necesarios para favorecer la acumulación en el fagolisosoma del macrófago, ^[9a-b] que es clave para garantizar un contacto directo entre parásito y compuesto, además de los efectos sobre el kinetoplasto parasitario y efectos inmunológicos ^[9a].

2.4. 4-Aminoquinolinas como agentes leishmanicidas

Dentro de la búsqueda de nuevas clases de moléculas que sean activas, los derivados de quinolinas, en particular los de 4-aminoquinolina, han demostrado tener un amplio rango de actividades biológicas incluyendo: anticáncer, antiparasitaria, antifúngica, antiviral y antibacterial, sin tener una toxicidad alta en mamíferos ^[10]. Estudios realizados sobre derivados de 4-aminoquinolinas evidenciaron que esta clase de compuesto tiene actividad parasitocida frente a varias especies de *Leishmania*, y baja toxicidad frente a macrófagos murinos ^[9a,11]. Si bien se han registrado en ensayos distintos tipos de efectos de las 4-aminoquinolinas en los parásitos, así como en macrófagos, el o los mecanismos por los cuales estas presentan actividad antiparasitaria no están del todo claros para la mayoría de los casos.

Sin embargo, desde el punto de vista estructural, ciertas modificaciones en las funcionalidades de las 4-aminoquinolinas han permitido la modulación conveniente de la actividad leishmanicida contra la forma amastigote. En la **Figura 5** se muestran algunos ejemplos de 4-aminoquinolinas con actividad leishmanicida contra amastigote de diferentes especies de *Leishmania* ^[9a,11]. Notar que tanto la presencia de un grupo amino terciario a lo largo de la cadena dialquilamino en posición 4 así como la incorporación de grupos altamente lipofílicos (ej. fenilos, ciclohexilo, ferrocenilo, etc) parecen estar jugando un rol importante en la respuesta leishmanicida de estos compuestos

contra la forma amastigote, así como en la selectividad. Adicionalmente, la presencia de estos dos tipos de grupos (amino terciario y grupo lipofílico) pueden estar contribuyendo a su acumulación en el fagolisosoma del macrófago, facilitando un efecto leishmanicida significativo y mejor selectividad ^[9a]. En ese sentido, es importante mencionar que grupos básicos, generalmente al final de la cadena de 4-alquil/arilamino posicionada en la posición 4 es fundamental, ya que permite acceder a valores de constantes de ionización ácidas (pK_a) alrededor de 4 y 6 para garantizar acumulación al pH del fagolisosoma como fue descrito por Trapp ^[12]. Adicionalmente, los sustituyentes lipofílicos favorecen la permeabilidad en membranas celulares, mejorando la acumulación en organelos clave, como lo pueden ser el fagolisosoma, el ácidocalcisoma o los compartimentos mitocondriales ácidos ^[13]. Por otro lado, las modificaciones en la región quinolínica influyen en la selectividad y la potencia del compuesto, dependiendo de la presencia de halógenos, heteroátomos o grupos funcionales adicionales. En este caso, la adición de grupos fenilos en posición 2 de la quinolina demostró generar compuestos con actividad inmunomoduladora ^[11c]. En general, el cloro en posición 7 parece ser importante frente a la actividad biológica de los compuestos 4-aminoquinolinas, así también la adición de aminas terciarias que por sus características fisicoquímicas permiten la acumulación en organelos o compartimentos ácidos dentro de la célula hospedera y del parásito intracelular. Si bien los grupos lipofílicos, tanto en la cadena dialquilamina o sobre la quinolina, mejoran la potencia y selectividad, cuando el grupo es alquildiamina, el largo de la cadena influye negativamente disminuyendo la selectividad y aumentando la toxicidad de esos derivados ^[11c].

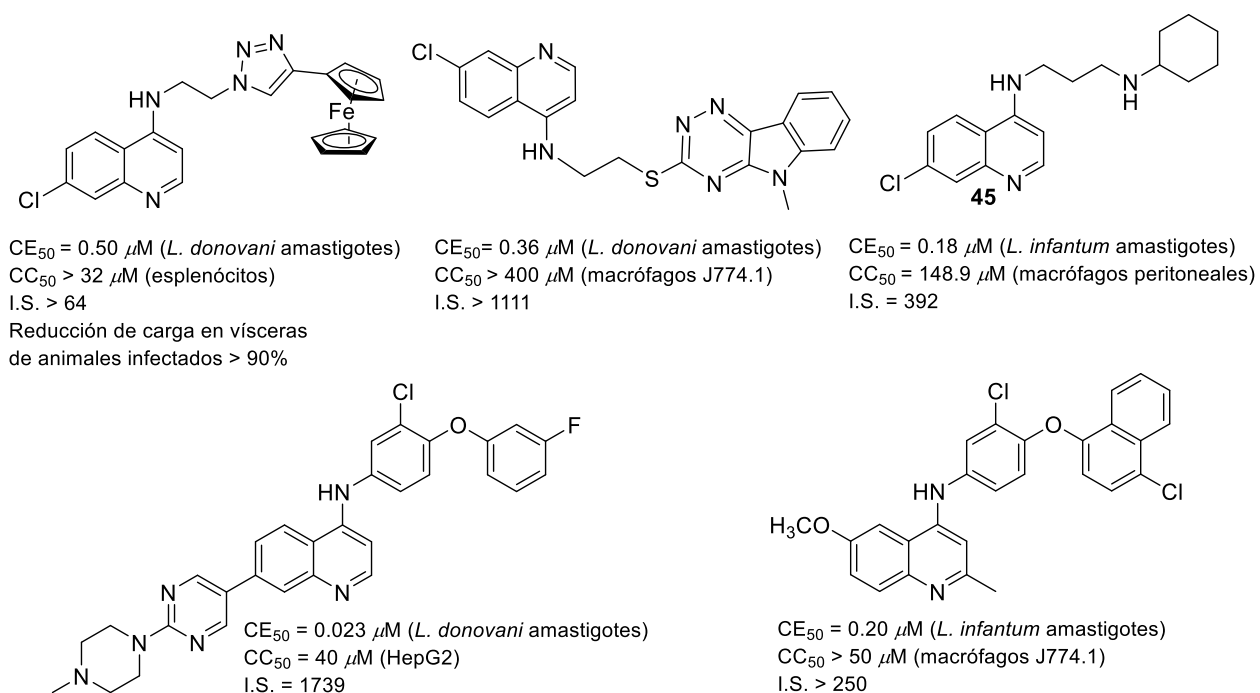


Figura 5. Derivados 4-aminoquinolinas relevantes en la búsqueda de agentes potentes contra la leishmaniasis [ver detalles y otros ejemplos en revisión (11c)]. CE_{50} , Concentración Efectiva 50 (definida contra parásitos); CC_{50} , Concentración Citotóxica 50 (definida contra célula hospedera mamífera) e $I.S.$, Índice de Selectividad = CC_{50}/CE_{50} .

En general, es bien documentado que derivados de 7-cloro-4-aminoquinolinas inducen cambios importantes en membrana celular del parásito, cambiando su morfología en las formas axénica (promastigote y amastigote axénicos) promovidos por cambios moleculares generados por estrés oxidativo derivados de un aumento de las especies reactivas de oxígeno (*ROS*), además de un cambio en la polaridad de la membrana mitocondrial, ambas situaciones metabólicas relacionadas a la muerte apoptótica en los parásitos [9a,11]. Con respecto a este punto, la sitamaquina genera reducción de los niveles de *ATP* en promastigote de *L. donovani*, relacionados a la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa, afectando en el complejo II de la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial, generando un menor consumo de oxígeno y menor capacidad de generación de *ATP* (principal fuente de *ATP* en estos parásitos es la fosforilación oxidativa), llevando a los parásitos a estar bajo estrés energético [14]. Además, este compuesto genera la despolarización de la membrana mitocondrial y el aumento de *ROS*, asociado a la homeostasis del Ca^{2+} alterada [14]. Otros estudios han encontrado que la cloroquina tiende a acumularse en los

compartimentos intracelulares ácidos como lo es la vacuola parasitófora ^[15]. También se ha reportado que algunas ferrocenilquinolinas solubles en agua conseguían inducir la expresión de citocinas proinflamatorias por interacción con receptores de reconocimiento de patrón (*PRR*_s) y la disminución en la expresión de citocinas antiinflamatorias, que en conjunto aumentan la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa, que es uno de los mecanismos del macrófago para combatir al parásito (efecto inmunoestimulante) ^[16]. El mismo estudio evidenció que algunas ferrocenilquinolinas inhiben la expresión de la enzima de *L. infantum* tripanotiona-disulfuro reductasa, además de ser un inhibidor competitivo a nivel de *NADPH* y *FAD*, generando inactivación del principal mecanismo de defensa contra *ROS* del parásito, que es la reducción sucesiva de la tripanotiona disulfuro a tripanotiona para que pueda oxidarse reduciendo así a los ataques efectivos de *ROS* del macrófago ^[16].

Estas evidencias descritas sugieren que el mecanismo de acción de esta clase de compuestos, dependiendo de su estructura, está relacionado a su interacción con las membranas, el metabolismo de *ROS*, la cadena de electrones de la membrana mitocondrial y la homeostasis de calcio del parásito y potencial inmunoestimulación de la célula huésped (macrófago). Más allá de los aspectos mecanísticos, algunos factores fisicoquímicos tales como la solubilidad en agua, lipofilia y constante de ionización (*pK_a*) son importantes en el diseño de un potente agente antitripanosomático basado en 4-aminoquinolinas. Son convenientes una buena o moderada solubilidad en agua, conveniente lipofilia por incorporación de grupos fenilos, que se ha visto que aumentan la actividad de forma considerable en algunos casos, ^[17] y la existencia preferiblemente de un grupo básico amino terciario que permite que este se acumule convenientemente dentro de la vacuola del parásito, que es ácida, mediante una ionización ácido-base a favor del gradiente ^[15]. En algunos reportes previos, se ha podido evidenciar la importancia de la incorporación de grupo básico terciarios sobre secundarios y primarios en cuanto a mejorar la selectividad y actividad, ^[15] aunque no existe un consenso bien definido sobre su importancia tal como si está bien descrito para el parásito *Plasmodium falciparum*, responsable de Malaria en humanos.

A nivel inmunológico, se encontraron moléculas quinolínicas con efectos claros sobre el sistema inmune innato ^[18,19]. El Imiquimod y resiquimod son agonistas de receptores *TLR7* y *TLR8*, receptores esenciales para la detección de patrones virales como lo son las cadenas monocatenarias de *ARN* viral. Esta activación promueve la producción de interferones tipo I (*IFN-α*, *IFN-β*) y citocinas proinflamatorias como *TNF-α* e *IL-6*. El imiquimod es agonista específico del *TLR7*,

mientras que el resiquimod es agonista dual de *TLR7* y *TLR8*, siendo ambos compuestos herramientas prometedoras para el tratamiento de infecciones virales y cáncer, donde el perfil de citoquinas liberadas por las células activadas por estos receptores es el adecuado para tales patologías, aunque por sus diferencias estructurales y de activación, difieren en su especificidad y alcance clínico ^[18]. La cloroquina y la hidroxicloroquina, derivados 4-aminoquinolina, ejercen un impacto significativo sobre el sistema inmune a través de diversos mecanismos. Estas moléculas modulan la inflamación al interferir con la acidificación de los endosomas, lo que afecta la presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos y reduce la activación de las células T ^[19]. Además, inhiben la señalización de los receptores tipo Toll (*TLR7* y *TLR9*), disminuyendo la liberación de citocinas proinflamatorias como *IL-6*, *IL-1 β* y *TNF- α* , y limitan la diferenciación de las células *T helper 17* (Th17) ^[19]. Se reporta que estos compuestos generan estrés férrico, al alterar la endocitosis del complejo transferrina-receptor 1 y reducir la liberación de hierro de los endosomas al citosol, lo que limita recursos metabólicos esenciales tanto para las células inmunes como para los virus ^[19]. Asimismo, regulan negativamente vías de señalización como *p38 MAPK*, reduciendo la liberación de citocinas inflamatorias, y atenúan la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (*NETs*), que contribuyen a la inflamación y la trombosis. Estas moléculas también poseen propiedades antivirales al interferir con el *pH* intracelular en endosomas y lisosomas, bloqueando etapas clave del ciclo viral ^[19].

2.5. Sistemas de isoquina e isotebuquinas y antecedentes como leishmanicida

La isoquina es un sistema químico de 4-aminoquinolina basada en una 7-cloroquinolina sustituida en la posición 4 por el grupo 4-(*N,N*-dietilamino)metil-3-hidroxianilino, mientras la isotebuquina consta de una 7-cloroquinolina funcionalizada con 2-(*N,N*-dialquilamino)metil-3-(4-clorofenil)-5-hidroxianilino tal como se muestran en la **Figura 6**, respectivamente. La definición *iso* en la isoquina e la isotebuquina viene dada por un intercambio de las funcionalidades hidroxilo y dialquilamino entre las posiciones 3 y 4 del fragmento anilínico respecto a la amodiaquina y tebuquina, respectivamente. Estos sistemas quinolínicos fueron preparados inicialmente por el grupo de Paul O'Neill en 1983 ^[15b]. Estos compuestos fueron probados como agentes antimaláricos, encontrándose una apreciable respuesta *in vitro* contra el parásito *P. falciparum* así como buenos resultados *in vivo* en modelos de *P. falciparum* con propiedades logrando una significativa reducción de parasitemia y alta supervivencia de animales infectados. En particular,

la isoquina estuvo bajo investigación llegando hasta la fase preclínica II, siendo suprimido su investigación por efectos secundarios y baja acumulación en plasma, los cuales se creen están asociados a la presencia del grupo hidroxilo ^[15c].

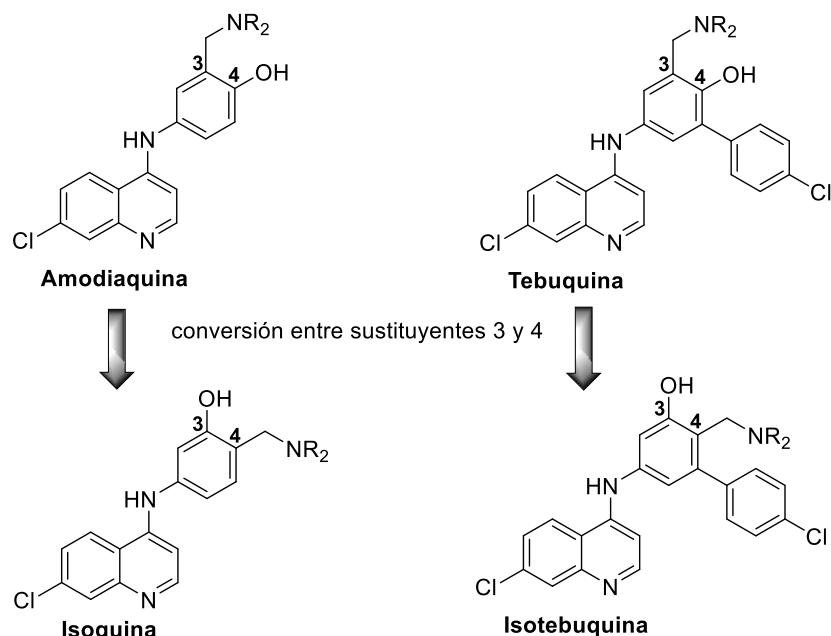


Figura 6. Estructura base de derivados deshidroxilados de isoquina e isotebuquina.

Hablando de derivados deshidroxilados de isoquina e isotebuquina, Romero y colaboradores diseñaron y prepararon por primera vez una serie de derivados deshidroxilados de isoquina e isotebuquina para evaluar su potencial como agente antimalárico, encontrándose tanto una excelente reducción de la parasitemia (99 % comparando con controles negativos), una alta tasa de supervivencia (> 29 días para un test de 30 días) y una excelente inhibición de la polimerización de la β -hematina como blanco terapéutico ^[10b-c].

En el contexto de la leishmaniasis, recientemente, nuestro grupo exploró el potencial de esta misma serie de derivados deshidroxilados de isoquina e isotebuquina contra modelos *in vitro* e *in vivo* de LC y LV. En 2019 reportamos el efecto leishmanicida de ellos contra modelos *in vitro* de LC infectados con *L. braziliensis* y *L. mexicana* ^[20a]. En general, de una serie de 13 derivados, tres de ellos, **I**, **II** y **III**, fueron identificados como potenciales agentes leishmanicidas debido a su remarcable efecto contra modelos *in vitro* de promastigote y moderada citotoxicidad sobre fibroblastos, dando índices de selectividad (I.S.) de 11.4, 14.1 y 52.1, respectivamente, para el modelo de *L. braziliensis* y de 17.9, 18.3 y 24.1, respectivamente, para el modelo de *L. mexicana*.

Contra modelos *in vitro* de amastigotes intracelulares, el compuesto **III** mostró una mejor respuesta leishmanicida ($CE_{50} = 13.9 \mu M$) que los compuestos **I** ($CE_{50} = 22.6 \mu M$) y **II** ($CE_{50} = 19.3 \mu M$), lo cual implicó valores de I.S. de 14.3, 6.1 y 5.2, respectivamente (**Figura 7**). Es importante mencionar que la actividad antiamastigote del compuesto **I** fue ligeramente superior a aquella encontrada por tratamiento con el fármaco de referencia, glucantime ($CE_{50} = 15.1 \mu M$). También es importante mencionar que el compuesto **III** mostró el mayor efecto leishmanicida contra líneas resistentes de *L. braziliensis*, dando valores de CE_{50} de $25.2 \mu M$ (I.S. 7.8), el cual que fue muy superior a la respuesta obtenida para el glucantime ($CE_{50} > 50 \mu M$). En dicho reporte, también encontramos que la acción de estos compuestos incrementaba las concentraciones de óxido nítrico en comparación con controles no tratados y controles tratados con glucantime, lo cual sugiere la capacidad de estos compuestos de promover la producción de óxido nítrico en el modelo *in vitro* de macrófagos infectados. Esto último abre las puertas a pensar que exista un efecto inmunoestimulador hacia el macrófago por parte de los derivados deshidroxilados de isoquina y los de isotebuquina, lo cual ha sido reportado para diversos tipos de compuestos basados en 4-aminoquinolinas funcionalizadas por un grupo anilino en posición 4 del anillo de quinolina ^[9a]. Para ampliar dicha investigación, muy recientemente, en colaboración con el grupo de Dra. Gloria Yaluff de la Universidad Nacional de Asunción, probamos la eficacia del compuesto **III** en un modelo *in vivo* de LC infectado con *L. braziliensis*. El compuesto mostró una alta capacidad de reducir el tamaño de la lesión, con una significativa reducción de la parasitemia en más de un 60% de la carga parasitaria en los animales tratados, bajo un tratamiento intralesional, sin efectos adversos apreciables, siendo su efecto terapéutico superior al mostrado por los ratones tratados con glucantime ^[20c].

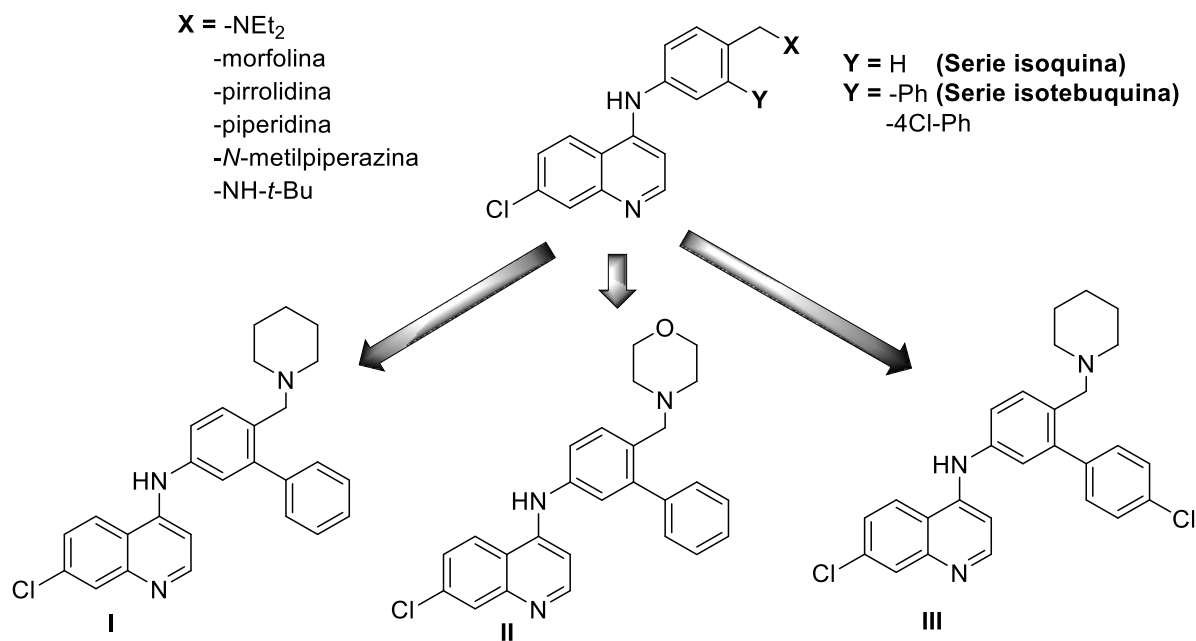


Figura 7. Estructura de derivados de isoquina e isotebuquina **I**, **II** y **III**, reportados por Romero [20a].

Contra modelos de LV infectados con *L. infantum*, muy recientemente, en colaboración con el grupo de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo hemos logrado identificar el potencial de esta misma serie de derivados de isoquina e isotebuquina deshidroxilados probando alguno de sus derivados. Basados en el efecto contra la forma clínicamente relevante, dentro de los derivados de isoquina, es importante mencionar que sólo fue probado el derivado de funcionalizado con morfolina como dialquilamino terminal contra modelos de amastigote debido a que la mayoría de sus derivados no mostró respuesta contra promastigote de *L. infantum* a 25 μ M. Este derivado de morfolino mostró un remarcable efecto antiamastigote, con *clearance* (toxicidad sobre el parásito y no sobre célula hospedera validada por microscopía) y no apreciable toxicidad en macrófagos humanos derivados de monocitos THP-1. Respecto a los derivados de isotebuquina, encontramos algunas correlaciones interesantes entre la actividad, toxicidad y estructura química. En general, encontramos que la incorporación del grupo pirrolidino incrementó significativamente la toxicidad, mientras la presencia de dietilamino y *N*-metil piperazina generaba compuestos no activos. Por su parte, la piperidina y morfolina fueron altamente convenientes, aunque el grupo piperidino mostró un discreto efecto citotóxico. Respecto al rol del grupo fenilo, encontramos que aquellos derivados que presentaban el grupo fenilo sin sustituyente resultaron ligeramente más tóxicos que aquellos derivados funcionalizados con el

grupo 4-clorofenilo, aunque estos últimos presentaban un efecto leishmanicida discretamente menor. Con las observaciones de esta investigación que se encuentra aún en desarrollo, los derivados **I** y **II** (**Figura 7**) así como el de isoquina deshidroxilado sustituido por morfolino como grupo X, fueron identificados como potenciales candidatos contra LV para introducir mayores modificaciones químicas. Es importante mencionar que los derivados **I** y **II** mostraron una buena estabilidad metabólica hepática y no mutagenicidad por el test de Ames, ^[20c] siendo un factor añadido a la seguridad de este tipo de derivados.

Con estos resultados se realizó un análisis estructura actividad inicial derivado de la actividad leishmanicida contra modelos de LV, detallado en la **Figura 8**, donde se refleja que la incorporación de grupo anilínico sustituyendo a la dialquildiamino es importante, ya que la cloroquina mostró una discreta respuesta antiamastigote ($CE_{50} \sim 20 \mu M$, I.S. > 1 , ver **Tabla 14**), mientras que derivados más lipofílicos y rígidos como un derivado de isoquina, el de morfolina así como varios de los derivados de isotebuquina mostraron buena a moderada actividad ($CE_{50} \sim 1.25 - 20 \mu M$, I.S. > 1 a 16). Respecto a los derivados de isotebuquina probados contra LV, pudo ser notado que la introducción del átomo de cloro en sustitución a el hidrógeno como grupo **Z** en el anillo de fenilo (**ver Figura 8**) permitió reducir la toxicidad con una ligera caída de la actividad biológica quizás como consecuencia de la pérdida de solubilidad que se aprecia en el ensayo, lo cual abre la puerta a plantear alternativas tal como la incorporación de un halógeno menos lipofílico y más hidrofílico como el flúor para conseguir alguna modulación de la actividad y selectividad. Además, puede resultar interesante la incorporación de grupos trifluorometilados, los cuales son ampliamente utilizados en la química medicinal en el diseño de agentes parasitarios ^[20b] y que han permitido mejorar la actividad antiparasitaria y selectividad en sus sistemas mediante alcanzar un mejor balance entre la lipofilia e hidrofilia. También en los derivados de isotebuquina, es preciso resaltar de la importancia de los grupos amino terciarios (**X**, **ver Figura 8**) de morfolino, pirrolidino y piperidino, donde la incorporación del grupo piperidina y pirrolidino genera los compuestos más activos, pero con un cierto grado de toxicidad, mientras que la incorporación de grupo morfolino envolvió una ligera pérdida de la actividad leishmanicida, pero de menor toxicidad. Por tanto, la incorporación de halógenos alternativos al cloro (como flúor y trifluorometil ^[20b]) como sustituyente **Z** en el grupo fenilo de los derivados isotebuquina representa una alternativa para modular lipofilia (solubilidad), actividad leishmanicida y selectividad, muy

especialmente en derivados deshidroxilados de isotebuquina funcionalizados con pirrolidina y piperidina.

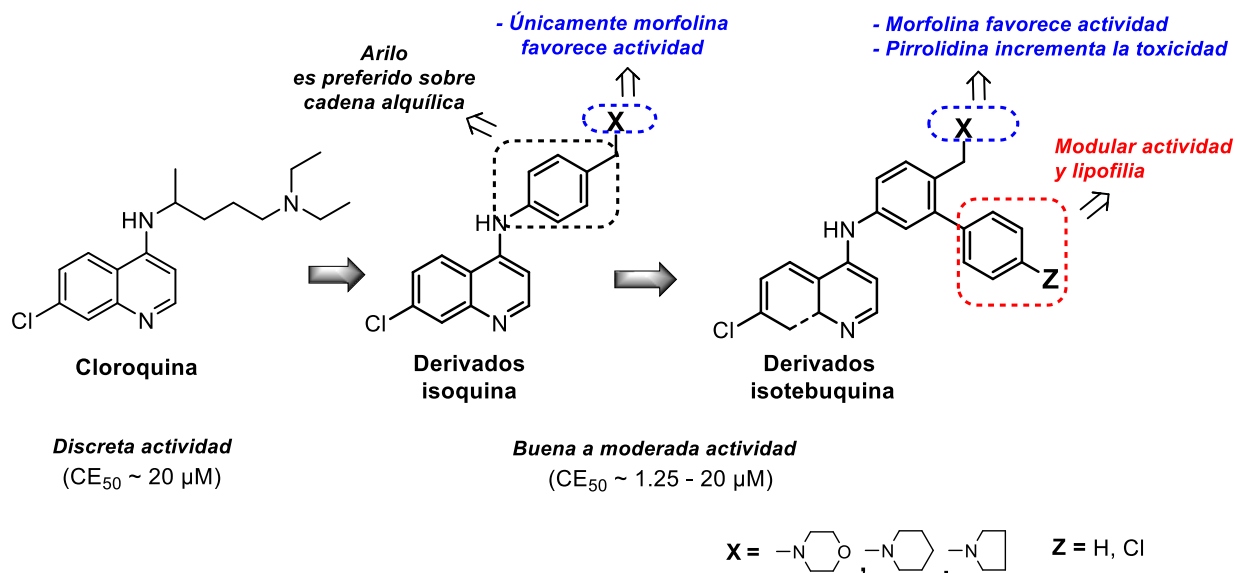


Figura 8. Identificación del sistema deshidroxilado de isotebuquina como potencial plataforma para el diseño de agentes leishmanicidas y su respectivo análisis de la relación estructura-actividad derivada de estudios preliminares en el modelo de infección de macrófagos humanos con *Leishmania. infantum* ^[20c]. I.S., Índice de Selectividad. CE₅₀, Concentración Efectiva 50.

2.6. Importancia de la basicidad y lipofilidad en el diseño de agentes leishmanicidas

El parásito *Leishmania* se aloja dentro de los fagolisosomas del macrófago, aprovechando la presencia de moléculas en su superficie que facilitan su internalización. Una vez en este ambiente, las condiciones intralisosomales, como el *pH* ácido (4-5) y la temperatura fisiológica mamífera, desencadenan su diferenciación de promastigote a amastigote. Dado su papel esencial en la supervivencia del parásito, la fagolisosoma del macrófago se postula como un blanco estratégico para el diseño de fármacos leishmanicidas (**Figura 9**), priorizando aquellos que puedan acumularse eficazmente en su interior.

La acumulación de un fármaco en los lisosomas depende de ciertas propiedades fisicoquímicas, evidenciado en los trabajos de Trapp ^[12] y Marceau, ^[13] siendo particularmente importantes la lipofilidad y la presencia de grupos básicos débiles. Estos compuestos atraviesan la membrana lipídica en su forma neutra y, una vez en el ambiente ácido del lisosoma, se protonan, quedando atrapados en su interior. Se ha identificado que los derivados de quinolina con determinados

valores de pK_a de 10 en el grupo amino terciario para compuestos quinolínicos monobásicos y de pK_a quinolínico entre 4 y 6 y de valores de pK_a menores a 10 en grupos amino terminales para quinolinas dibásicas, son altamente convenientes para garantizar acumulación en el interior de lisosoma^[12]. Por su parte, Marceau demostró que el control de la lipofilia también es esencial para garantizar la acumulación en el lisosoma,^[13] encontrando que la mayor acumulación óptima para compuestos con valores de Log P entre 4 y 6. Una comparación cualitativa de los derivados 4-aminoquinolinos reportados^[11] muestra que ellos cumplen con estas características de basicidad y lipofilia indicadas por Trapp^[12] y Marceau,^[13] siendo por lo tanto dos parámetros claves a tomar en cuenta para el diseño racional de agentes leishmanicidas basados en 4-aminoquinolinas. Esto refleja la importancia del grupo dialquilamino terminal y grupos que incrementen la lipofilia en rangos apropiados.

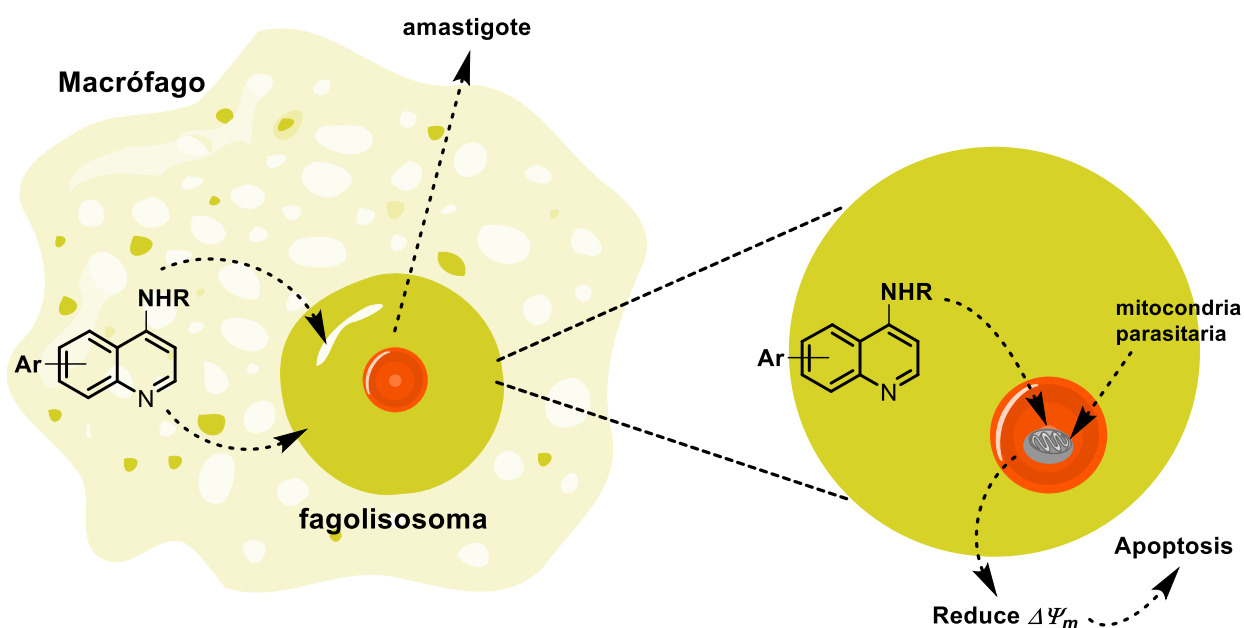


Figure 9. Mecanismo tentativo para la acumulación de compuestos 4-aminoquinolína en el fagolisosoma y efecto sobre el amastigote intracelular. Tomado de la referencia [9a]. $\Delta\Psi_m$, Potencial de membrana.

Asimismo, algunos derivados de quinolina pueden interferir con otros compartimentos ácidos del parásito, como los ácidocalcisomas, que participan en la homeostasis del calcio y el metabolismo energético^[10b-c]. La alteración de estos procesos puede llevar a un desequilibrio celular que favorece la muerte del parásito. Los ácidocalcisomas son un compartimento relevante

en *Leishmania* y otros tripanosomátidos. Estas estructuras, ricas en calcio y con un *pH* ácido, desempeñan un papel clave en la homeostasis celular del parásito. Algunos compuestos, como la sitamaquina, han demostrado una rápida acumulación en estos organelos, lo que sugiere que podrían representar un objetivo prometedor en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra la leishmaniasis ^[21a-b]. Varios fármacos de esta clase han sido estudiados no solo por su actividad antiparasitaria, sino también por su capacidad de interferir con la función lisosomal en células tumorales ^[21c]. Su acumulación en los lisosomas de estas células puede bloquear la autofagia, aumentar el estrés celular e inducir apoptosis. Por microscopía de fluorescencia se ha confirmado que ciertos derivados de quinolina se acumulan selectivamente en los lisosomas de macrófagos y células tumorales, lo que refuerza su potencial como agentes terapéuticos ^[21d-f].

2.7. Justificación

Por los recientes antecedentes, los sistemas de 4-aminoquinolinas de isoquina e isotebuquina representan una novedosa y potencial plataforma para el diseño de agentes leishmanicidas contra LV, por el apreciable efecto de algunos de sus derivados contra el estadio clínicamente relevante de amastigotes intracelulares, baja toxicidad y remarcable *clearance* a baja concentraciones. Diversas investigaciones describen que la incorporación de grupos básicos (ejemplo, amino terciarios), así como grupos lipofílicos son claves para modular la selectividad y generar compuestos activos, lo cual pudimos apreciar en los derivados de isoquina e isotebuquina probados; sin embargo, es preciso una mayor investigación con la preparación de nuevos sistemas basados en derivados de isoquina e isotebuquina para evaluar el rol de la constante de ionización y lipofilia ^[21]. La disminución del efecto biológico para algunos derivados de isotebuquina por la incorporación de 4-clorofenilo y la generación de compuestos altamente tóxicos con la presencia de pirrolidina y piperidina obligan a investigar sobre la mejor combinación entre constante de ionización y lipofilia (selectividad) para modular la selectividad.

Para abordar estos dos aspectos, en la presente investigación se planteó el diseño, síntesis química y evaluación leishmanicida *in vitro* contra un modelo de infección de macrófagos humanos infectados con *L. infantum* de nuevos análogos deshidroxilados de isoquina (**Figura 10A**) y otros derivados de isotebuquina (**Figura 10B**). La preparación del primer grupo busca verificar si la reducción de constante de ionización puede mejorar la actividad y selectividad contra modelos de LV. Para ello sobre los derivados de isoquina, se busca verificar el efecto de halógenos

(iodo, bromo, cloro y flúor) en la posición *orto*-respecto al grupo dialquil-aminometil en el fragmento anilínico de la quinolina. Esto busca verificar si se puede mejorar la selectividad de los derivados de isoquina funcionalizadas por piperidina y pirrolidina por el control de basicidad del grupo básico mediante la incorporación de este grupo electro-deficiente vecino de halógeno.

Por su parte, con los sistemas de isotebuquina se busca mejorar la lipofilicidad, pero sin comprometer la solubilidad, como ocurría con 4-clorofenilo, por lo cual se plantea la incorporación de sustituyentes basados en flúor, tal como sustituyentes de flúor y trifluórmétilo en las posiciones 3' y 4' en el anillo de fenilo. Es preciso recordar que el flúor es el menos lipofílico de los halógenos, y posee una cierta característica hidrofílica por su capacidad de formar enlace de hidrógeno fuertes con moléculas próticas. Este tipo de funcionalidad también se busca generar compuestos con mejor solubilidad en medio de cultivo que sus análogos clorados, que presentaron el problema de precipitación que puede estar comprometiendo la potencia leishmanicida.

Con esto, el presente trabajo planteó mejorar la selectividad de los derivados de isoquina e isotebuquina deshidroxilados mediante la incorporación de halógenos y grupos fenilos, respectivamente. Entonces, la presente investigación busca la optimización de esta plataforma química en busca de nuevos compuestos con buena potencia leishmanicida y selectivos.

Concretamente esta investigación busca responder las siguientes preguntas:

¿Es posible mejorar la selectividad de los derivados de isotebuquina con la modulación de la lipofilicidad y solubilidad en medio de cultivo incorporando grupos fenilos funcionalizados con grupos flúorados?

¿Es posible mejorar la selectividad de los derivados de isoquina con la modulación de la constante de ionización y lipofilia incorporando grupos halógenos en la posición adyacente al grupo dialquilaminometil?

¿Es posible reconocer un potencial *hit* para avanzar en los estudios preclínicos?

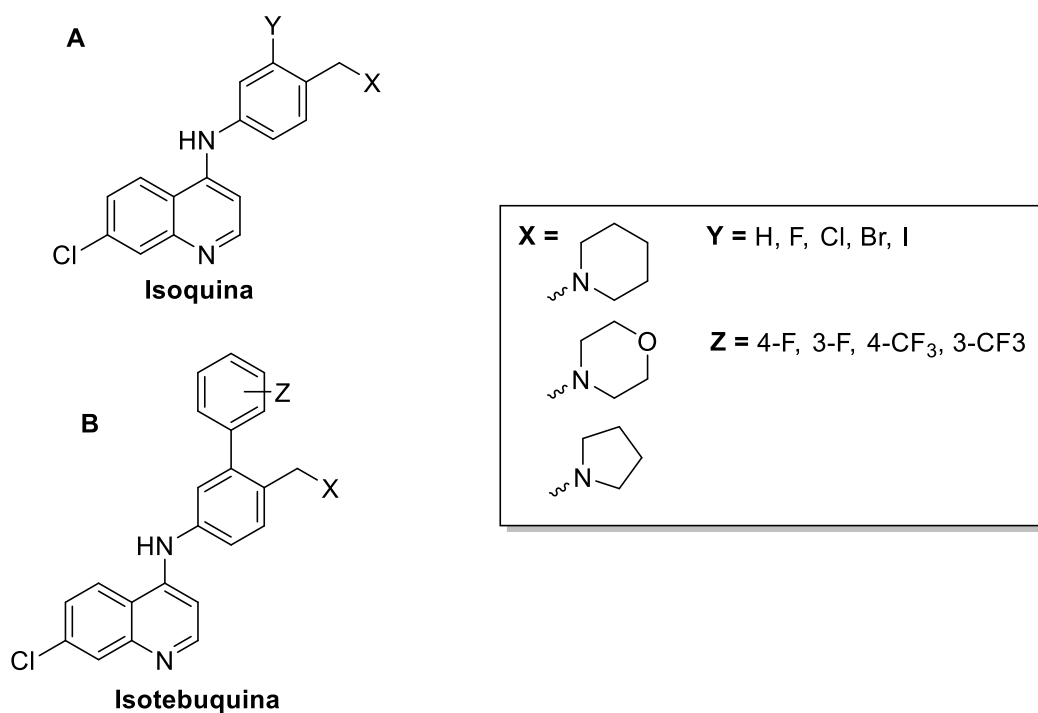


Figura 10. Derivados de isoquina **A** e isotebuquina **B**.

3. OBJETIVOS

Identificar agentes derivados de isoquina e isotebuquina activos y selectivos en macrófagos humanos infectados con *L. infantum*.

3.1. Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar una serie de derivados deshidroxilados de isoquina **4a-o**
- Sintetizar y caracterizar una serie de derivados deshidroxilados de isotebuquina **10a-k**
- Evaluar la actividad leishmanicida *in vitro* de los derivados deshidroxilados de isoquina e isotebuquina contra macrófagos humanos infectados con *L. infantum*.
- Identificar el rol de las diferentes funcionalidades en los derivados de isoquina e isotebuquina contra el modelo de infección.
- Identificar agentes activos y selectivos derivados de isoquina o isotebuquina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Química

4.1.1 Generalidades

Para llevar a cabo la síntesis y caracterización de los compuestos orgánicos presentados en este trabajo, se dispuso de los siguientes materiales y equipos:

- Material de vidrio presente en el Laboratorio de Química Orgánica Medicinal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Evaporación de solventes a presión reducida (puntos de ebullición bajos y medios). La destilación de solventes tales como CH_2Cl_2 , CHCl_3 , *n*-hexano y acetato de etilo fueron realizados en un rotaevaporador marca BUCHI, modelo R-114, conectado a un baño de calentamiento marca BUCHI, modelo B-180, y a una bomba de vacío de marca Welch.
- Puntos de fusión: los puntos de fusión fueron medidos en un fusiómetro marca Fisher-John con un termómetro de 300 °C (± 1), y no están corregidos.
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN): los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^{19}F -RMN, $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC y $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC fueron realizados en un espectrómetro marca BRUKER Avance DPX-400 (400 MHz para los experimentos de ^1H -RMN; 100 MHz para ^{13}C -RMN), tomados en solventes deuterados como CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$.
- Un equipo de análisis elemental marca Perkin Elmer 2400 CHN *analyser* para la caracterización de productos finales ($< 0.4\%$).
- El avance de las reacciones y la pureza de los productos obtenidos se controlaron por cromatografía en capa fina con fase estacionaria sílica-gel (Kieselgel 60 F254) de la firma MERCK® y disolventes adecuados como fase móvil. Los métodos empleados para revelar las placas de *TLC* fueron: exposición a luz ultravioleta y exposición a vapores de yodo.
- Todos los espectros correspondientes a los intermedios y derivados finales se pueden encontrar en un documento digital llamado ANEXO.

Los siguientes reactivos como función de casa comercial fueron empleados sin previo tratamiento:

Fluka: Bromuro de 4-nitrobencilo (95%);

Sigma-Aldrich Co: Morfolina (99%), 4,7-dicloroquinolina (99%), etanol absoluto (100%), estaño (99%), ácido 4-flúorfenilborónico (95%), ácido 3-flúorfenilborónico (95%), ácido 4-

trifluorometilfenilborónico (95%), ácido 3-trifluorometilfenilborónico (95%), tetrakis (trifenilfosfina) Pd (0) (99%) y pirrolidina (99%).

Chemica: Pirrolidina (99%).

MERCK®: trietilamina (99%), CuI (99%) y H₂SO₄ (98%).

Dorwil: HCl (37%).

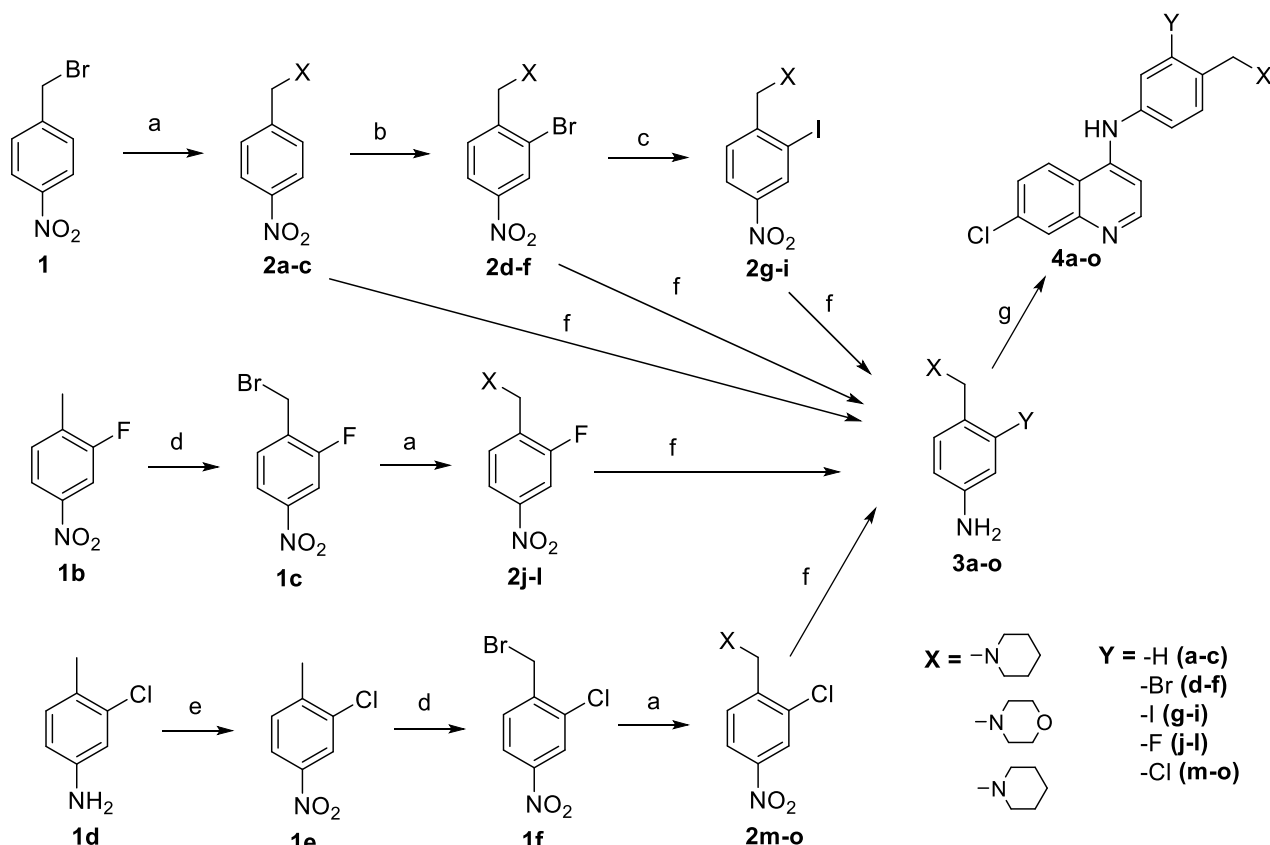
Acros Organics: *N*-bromosuccinimida (99%).

Droguería Paysandú: KHCO₃ y Ioduro de potasio.

Respecto a los solventes, diclorometano, acetato de etilo, *n*-hexano fueron adquiridos bajo forma técnica y posteriormente fueron purificados según un procedimiento de tratamiento y posterior destilación de acuerdo a técnica descrita en literatura ^[22]. Por su parte, otros disolventes tales como acetonitrilo (MERCK®), tolueno (MERCK®), cloroformo (MERCK®), diclorometano (Sigma-Aldrich Co), etanol anhidro (Sigma-Aldrich Co) fueron utilizados sin previa purificación.

4.1.2 Procedimientos de síntesis química

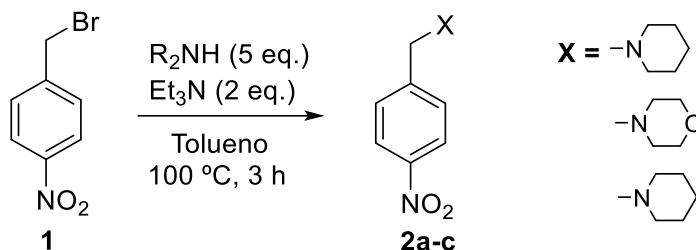
4.1.2.1 Síntesis de derivados deshidroxilados de isoquina



Esquema 1. Ruta general para la síntesis de derivados deshidroxilados de isoquina **4a-o**. Condiciones de reacción: (a) **1**, **1c** o **1f** (1 eq.), dialquilamina (5 eq.), Et₃N (5 eq.), tolueno, 100 °C, 4-6 h; (b) **2a-c** (1 eq.), NBS (1.1 eq.), H₂SO₄, 80 °C, 2 h; (c) **2d-f** (1 eq.), KI (10 eq.), CuI (0.5 eq.), ácido ascórbico (0.5 eq.), etanol-acetona, 80 °C, 24 h; (d) **1b** o **1e** (1 eq.), NBS (1.1 eq.), LED (13 W), acetinitrilo, 60 °C, 6 h; (e) **1d** (1 eq.), oxono (3 eq.), MnSO₄·7H₂O (3 eq.), 25 °C, 10-20 min.; (f) **2a-o** (1 eq.), Sn (3 eq.), HCl, 60 °C, 2 h; (g) **3a-o** (1 eq.), 4,7-dicloroquinolina (1.1 eq.), HCl (cat.), etanol, 95 °C, 24h.

4.1.2.1.1 Síntesis de intermedios de bencilaminos nitrados 2a-o (12 derivados)

4.1.2.1.1.1. Síntesis de los intermedios de *N*-(4-nitrobencil)dialquilamina **2a-c** a partir de bromuro de 4-nitrobencilo **1** [10c,23]



En un balón de fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se agregó 1-(bromometil)-4-nitrobenzeno (1 eq.), y se disolvió en tolueno (3 mL). Seguidamente, se añadió trietilamina (2 eq.), calentándolo a 100 °C. Posteriormente se agregó la dialquilamina correspondiente (5 eq.) gota a gota llevando la mezcla a reflujo por 3 horas bajo agitación constante. El avance de la reacción se siguió por *TLC* utilizando una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (8:2) como fase móvil. Pasadas tres horas la reacción se consideró completa, determinada mediante análisis de *TLC*. Al culminar la reacción, se deja enfriar a temperatura ambiente, evapora el tolueno y el exceso de dialquilamina por destilación al vacío y a la mezcla de reacción resultante se trata con extracciones con diclorometano habiendo neutralizado con hidróxido de sodio al 10%, con posterior secado de la fase orgánica aislando un aceite o sólido de bajo punto de fusión de color amarillo, naranja o rojizo según el caso (ver **Tabla 1**). Estos intermedios fueron caracterizados por ¹H-RMN y algún caso por ¹³C-RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo). Es preciso indicar que estos intermedios ya fueron preparados por el grupo en su momento y los datos espectroscópicos detallados se pueden encontrar en la referencia [10^c].

Tabla 1. Datos experimentales para la reacción de síntesis de *N*-(4-nitrobencil)dialquilamina **2a-c** a partir de 1-(bromometil)-4-nitrobenzeno **1**

Comp.	X	1 g (mol)	Et ₃ N g (mol)	R ₂ NH g (mol)	2a-c g (%R)	Aspecto	P.f. (°C)
2^a	Piperidina	3 (0.0138)	4.19 (0.0276)	5.88 (0.069)	2.80 (91)	Aceite naranja	----
2^b	Morfolina	3 (0.0138)	4.19 (0.0276)	5.92 (0.069)	2.25 (73)	Sólido amarillo	77.5 -77.8
2^c	Pirrolidina	3 (0.0138)	4.19 (0.0276)	2.94 (0.041)	1.81 (63)	Aceite marrón	----

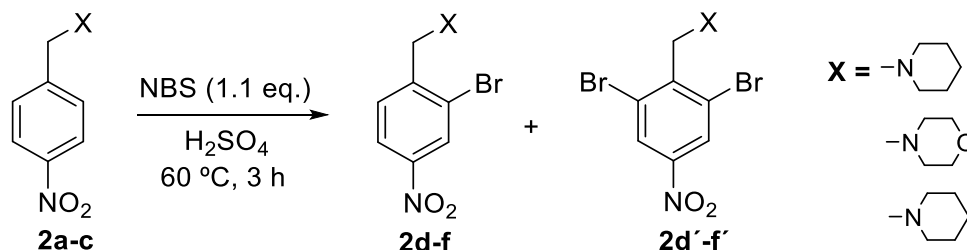
Datos espectroscópicos:

***N*-(4-nitrobencil)piperidina (2a):** aceite naranja, 2.8 g (rendimiento 91%), R_f = 0.3 (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 2.37 (t, 4H), 1.58 (m, 4H), 1.44 (m, 2H). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): 147.1, 147.0, 129.4 (2C), 123.4 (2C), 63.0, 54.7 (2C), 26.0 (2C), 24.2.

***N*-(4-nitrobencil)morfolina (2b):** sólido amarillo, 2.25 g (rendimiento 73%), P.f.: 77.5-77.8 °C, R_f = 0.25 (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.08 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.64 (t, 4H), 3.51 (s, 2H), 2.38 (t, 4H).

***N*-(4-nitrobencil)pirrolidina (2c):** aceite marrón, 1.81 g (rendimiento 63%), R_f = 0.2 (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.15 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.70 (s, 2H), 2.32 (t, 4H), 1.45 (m, 4H).

4.1.2.1.1.2. Síntesis de los intermedios de *N*-(2-bromo-4-nitrobencil)dialquilamina **2d-f a partir de bromación de *N*-(4-nitrobencil)dialquilamina **2a-c**** ^[24]



En un balón de fondo redondo (25 mL) de dos bocas provisto de un condensador, se colocó la 4-(4-nitrobencil)dialquilamina **2a-c** (1 eq.) correspondiente y se disolvió en H_2SO_4 concentrado (3 mL), calentándolo a 60 °C bajo agitación constante. Posteriormente, se agregó NBS (1.2 eq.) en tres porciones, añadiendo cada porción cada 15 minutos. Una vez que la reacción se consideró completa, determinada mediante análisis de *TLC*, la mezcla se vertió sobre hielo triturado (10 gramos). El medio se basificó con la adición cuidadosa de hidróxido de sodio 10% hasta alcanzar un *pH* alrededor de 9-10. Sobre esta fase acuosa se realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano (50 mL), la cual se secó obteniendo una mezcla, que se purificó por cromatografía en columna con sílica gel utilizando *n*-hexano: acetato de etilo (9:1) como fase móvil, aislando los productos monobromados correspondientes **2d-f**. Durante la cromatografía también fue identificado un derivado dibromado, el intermedio de morfolino **2e'**, que fue aislado de la cromatografía y que fue usado para desarrollar el derivado quinolínico correspondiente. Datos

detallados de las reacciones, estado físico, puntos de fusión se pueden encontrar en la **Tabla 2**. Estos nuevos intermedios fueron debidamente caracterizados por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 2. Datos experimentales para la reacción de síntesis de 4-(2-bromo-4-nitrobencil)dialquilamina **2d-f** y **2e'** a partir de 4-(4-nitrobencil)dialquilamina **2a-c**

Comp.	X, Y	2a-c g (mol)	NBS g (mol)	2d-f y 2 e' g (% R)	Aspecto	P.f.(°C)
2d	Piperidina, H	2 (0.009)	1.92 (0.011)	0.528 (19)	Sólido anaranjado	120 (desc.)
2e	Morfolina, H	2 (0.009)	1.91 (0.011)	0.819 (30)	Sólido amarillo	101 -102
2f	Pirrolidina, H	0.802 (0.004)	1.10 (0.005)	0.305 (27)	Aceite amarillo	----
2e'	Morfolina, Br	2 (0.009)	1.91 (0.011)	0.189 (6)	Sólido amarillo	102-102.5

Datos espectroscópicos:

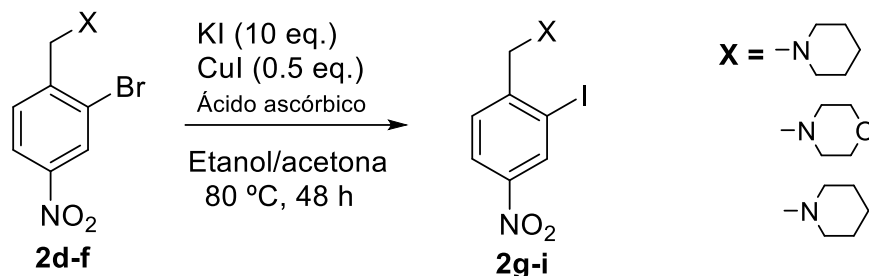
1-(2-Bromo-4-nitrobencil)piperidina (2d): sólido naranja, 528 mg (rendimiento 19%), P.f.: 120 °C (descomposición), $R_f=0.5$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.39 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 3.1, 8.0 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.59 (s, 2H), 2.46 (t, 4H), 1.62 (m, 4H), 1.47 (m, 2H). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 146.95, 130.53, 127.62, 123.98, 122.05, 77.02, 62.23, 54.87, 25.95, 24.03.

1-(2-bromo-4-nitrobencil)morfolina (2e): sólido amarillo, 819 mg (rendimiento 30%), P.f.: 101-102 °C, $R_f=0.3$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.42 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 3.0; 8.1 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.74 (t, 4H), 3.65 (s, 2H), 2.54 (t, 4H). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 147.19, 145.12, 130.62, 127.85, 124.27, 122.14, 66.99, 61.86, 53.58.

1-(2-bromo-4-nitrobencil)pirrolidina (2f): aceite amarillo, 305 mg (rendimiento 27%), $R_f=0.2$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 2.3; 8.5 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.79 (s, 2H), 2.61 (m, 4H), 1.84 (m, 4H). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 146.97, 146.66, 130.47, 127.61, 123.63, 122.18, 77.23, 59.40, 54.35, 23.75.

1-(2,6-dibromo-4-nitrobencil)morfolina (2e'): sólido amarillo, 189 mg (rendimiento 6%, revisar), P.f.: 102-102.5 °C, $R_f=0.4$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.06 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 3.69 (m, 4H), 3.59 (s, 2H), 2.48 (m, 4H). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 148.42, 144.14, 135.95, 129.61, 122.77, 113.52, 77.24, 66.94, 61.34, 53.62.

4.1.2.1.1.3. Síntesis de los intermedios de *N*-(2-iodo-4-nitrobenzil)dialquilamina **2g-i** a partir de *N*-(2-bromo-4-nitrobenzil)dialquilamina **2d-f** mediante acoplamiento de Filkenstein ^[25]



En un balón de dos bocas de fondo redondo (10 mL) provisto de un condensador, se colocó la 4-(2-bromo-4-nitrobenzil)dialquilamina **2d-f** (1 eq.) correspondiente, disuelta en una mezcla de etanol:acetona (1:1). Se lleva el sistema a atmosfera inerte con gas de nitrógeno, y se agregó KI (10 eq.), ascorbato sódico (50% mol) y el catalizador CuI (50% mol). Esta mezcla se llevó a reflujo a una temperatura de 100 °C por 48 hs en agitación constante. Pasado el tiempo, se evapora el solvente restante quedando un aceite marrón el cual es purificado por cromatografía en columna rápida utilizando *n*-hexano:acetato de etilo (8:2) como fase móvil para obtener el compuesto iodado **2g-i** correspondiente. Datos detallados de las reacciones, estado físico, puntos de fusión se pueden encontrar en la **Tabla 3**. Estos nuevos intermedios fueron debidamente caracterizados por ¹H-RMN y ¹³C-RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 3. Datos experimentales para la reacción de síntesis de 4-(2-iodo-4-nitrobenzil)dialquilaminas **2g-i** a partir de 4-(2-bromo-4-nitrobenzil)dialquilaminas **2d-f**

Comp.	X	2d-f g (mmol)	KI g (mmol)	CuI g (mmol)	NaAscb g (mmol)	2g-i mg (%R)	Aspecto	P.f. (°C)
2g	Piperidina	0.103 (0.31)	0.505 (3.05)	0.0055 (0.031)	0.0012(0.061)	95 (90)	Aceite amarillo	----
2h	Morfolina	0.042 (0.14)	0.232 (1.39)	0.0025 (0.014)	0.005 (0.028)	45 (93)	Sólido beige	76-77
2i	Pirrolidina	0.071 (0.25)	0.412 (2.48)	0.0047 (0.025)	0.009 (0.050)	75 (91)	Aceite amarillo	----

Datos espectroscópicos:

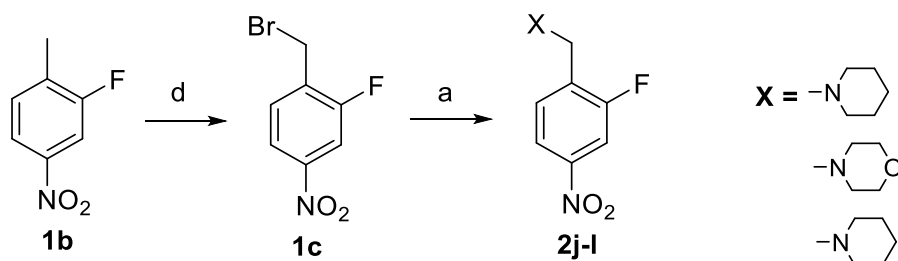
1-(2-Iodo-4-nitrobenzil)piperidina (2g): aceite amarillo, 95 mg (rendimiento 90%), $R_f=0.6$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.58 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.10 (dd, $J = 2.3$; 8.5 Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.50 (s, 2H), 2.44 (t, $J = 5.5$ Hz, 4H), 1.57 (m, 4H), 1.35 (m, 2H). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 148.37, 146.94, 134.07, 130.27, 122.89, 98.92, 66.75, 54.64, 25.77, 23.95.

1-(2-Iodo-4-nitrobencil)morfolina (2h): sólido beige, 45 mg (rendimiento 93%), P.f.: 76-77 °C, $R_f=0.4$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.67 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.20 (dd, $J = 2.4$; 8.5 Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.83 (s, 2H), 2.67 (t, 4H), 1.89 (t, 4H). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 144.55, 131.62, 127.74, 120.64, 96.11, 61.29, 51.69, 27.23, 21.20.

1-(2-Iodo-4-nitrobencil)pirrolidina (2i): aceite amarillo, 75 mg (rendimiento 91%), $R_f=0.3$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.19 (dd, $J = 2.4$; 8.5 Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.73 (s, 2H), 2.66-2.58 (m, 4H), 1.84 (m, 4H). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 149.02, 146.72, 134.02, 129.80, 122.96, 98.32, 64.17, 54.23, 23.77.

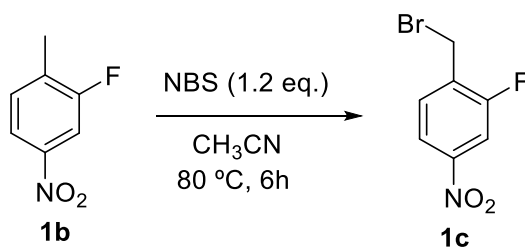
4.1.2.1.1.4. Síntesis de los intermedios de *N*-(2-flúoro-4-nitrobencil)dialquilamina **2j-l** a partir de una secuencia de dos reacciones de 2-flúoro-4-nitrotolueno **1b**

Para la preparación de los tres nuevos intermedios **2j-l** se planteó una ruta de dos pasos a partir del reactivo comercial de 2-flúor-4-nitrotolueno tal como se muestra en el **Esquema 2**.



Esquema 2. Ruta de síntesis para preparar los intermedios de *N*-(2-flúor-4-nitrobencil)dialquilaminas **2j-l**.

4.1.2.1.1.4.1. Síntesis de bromuro de 2-flúor-4-nitrobencilo **1c** a partir de 2-flúor-4-nitrotolueno **1b** ^[26]



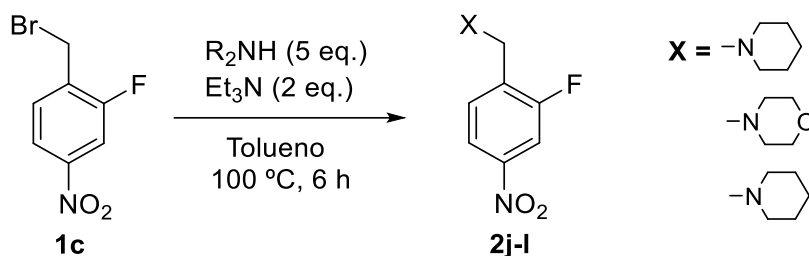
En un balón fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se colocó el 2-flúor-4-nitrotolueno **1b** (0.5 g, 0.003225 mol, 1 eq.) disuelto en acetonitrilo. Seguidamente, se agregó *N*-

bromosuccinimida (0.684 g, 0.00387, 1.2 eq.). Esta mezcla se llevó a reflujo a una temperatura de 80 °C por 6 horas bajo agitación constante, radiación continua de luz *LED* blanca (10 watts) y se siguió por *TLC* empleando una mezcla *n*-hexano/acetato de etilo (8:2). Al culminar la reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, filtrando luego la mezcla de reacción, aislando un sólido blanco correspondiente a la succinimida, y el solvente del filtrado resultante fue eliminado por presión reducida obteniendo una masa de 0.714 g del producto de monobromación **1c** bencílica en un 44% de la mezcla, pero lo suficientemente puro como para el siguiente paso de reacción. Este intermedio fue caracterizado por ¹H-RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Datos espectroscópicos:

1-(Bromometil)-2-flúoro-4-nitrobenceno (1c**):** aceite amarillo, 714 mg (conversión 44%), *R_f* = 0.3 (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 8.00 (m, 1H), 7.61 (dd, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H).

4.1.2.1.1.4.2. Síntesis de *N*-(2-flúor-4-nitrobencil)dialquilamina **2j-l** a partir de 1-(bromometil)-2-flúor-4-nitrobenzeno **1c** ^[10c, 23]



En un balón de fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se agregó 1-(bromometil)-2-flúor-4-nitrobenzeno **1c** (1 eq.), y se disolvió en tolueno (3 mL). Seguidamente, se añadió trietilamina (2 eq.), calentándolo a 100 °C. Posteriormente se agregó la dialquilamina correspondiente (5 eq.) gota a gota lavando la mezcla a reflujo por 6 horas bajo agitación constante. El avance de la reacción se siguió por *TLC* utilizando una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (8:2) como fase móvil. Pasadas tres horas la reacción se consideró completada, determinada mediante análisis de *TLC*. Al culminar la reacción, se deja enfriar a temperatura ambiente, evapora el tolueno y el exceso de dialquilamina por destilación al vacío y a la mezcla de reacción resultante se trata con extracciones con diclorometano habiendo neutralizado con hidróxido de sodio al 10 %, con posterior secado de la fase orgánica aislando la bencilamina **2j-l** correspondiente. Datos

detallados de las reacciones, estado físico se pueden encontrar en la **Tabla 4**. Estos nuevos intermedios fueron debidamente caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{19}F -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 4. Datos experimentales para la reacción de síntesis de *N*-(2-flúor-4-nitrobencil)dialquilaminas **2j-l** a partir de 1-(bromometil)-2-flúor-4-nitrobenzeno **1c**

Comp.	X	1b g (mmol)	Et₃N g (mmol)	R₂NH g (mmol)	2j-l g (%R)	Aspecto
2j	Piperidina	0.150 (0.64)	0.128 (1.3)	0.272 (3.2)	0.070 (45)	Aceite amarillo
2k	Morfolina	0.050 (0.21)	0.043(0.42)	0.092 (1.1)	0.0431 (85)	Aceite amarillo
2l	Pirrolidina	0.150 (0.64)	0.128 (1.3)	0.270 (3.2)	0.093 (65)	Aceite amarillo

Datos espectroscópicos:

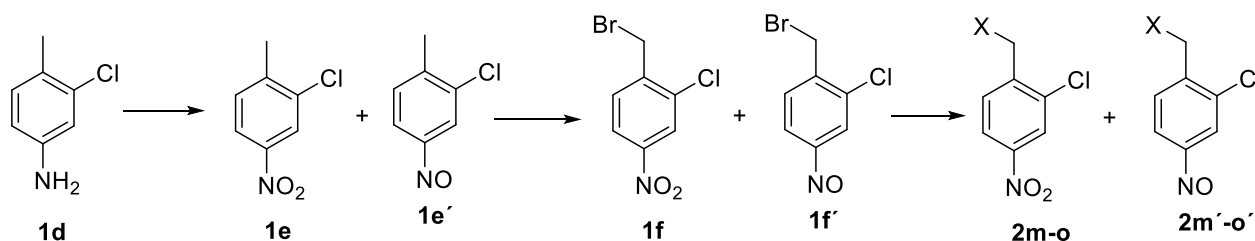
1-(2-Flúor-4-nitrobencil)piperidina (2j): aceite amarillo, 70 mg (rendimiento 45%), $R_f=0.3$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.01 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.89 (dd, $J = 9.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 8.4, 7.1$ Hz, 1H), 3.60 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H), 2.42 (dd, $J = 7.2, 3.6$ Hz, 4H), 1.67(m, 4H), 1.39 (m, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 161.71, 159.22, 133.78, 131.50, 119.01, 110.84, 55.47, 54.52, 25.97, 24.07. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -113.90.

1-(2-Flúor-4-nitrobencil)morfolina (2k): aceite amarillo, 43.1 mg (rendimiento 85%), $R_f=0.2$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.02 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 9.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 8.4, 7.1$ Hz, 1H), 3.72 (t, 4 H), 3.64 (d, $J = 1.4$ Hz, 2H), 2.54(t, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 160.31, 157.81, 146.33 (d, $J = 8.9$ Hz), 131.39, 130.01 (d, $J = 4.8$ Hz), 117.62 (d, $J = 3.7$ Hz), 109.56, 65.42, 53.66 (d, $J = 1.8$ Hz), 52.03. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -113.65.

1-(2-Flúor-4-nitrobencil)pirrolidina (2l): aceite amarillo, 93.0 mg (rendimiento 64%), $R_f=0.2$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.09 (m, 1H), 7.90 (dd, $J = 9.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.70 (m, 1H), 3.76 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 2.57 (m, 4H), 1.93 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 161.43, 158.94, 134.29, 131.40, 119.15, 111.20, 54.20, 52.44, 30.94, 23.58. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -114.01 (d, $J = 3.2$ Hz).

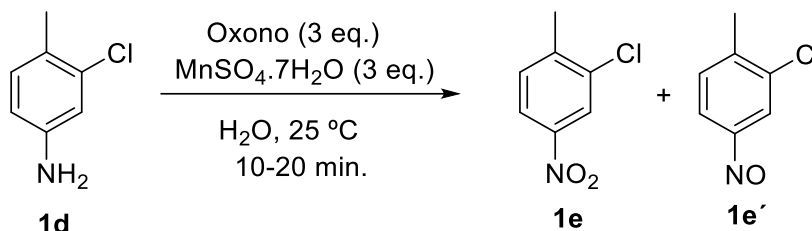
4.1.2.1.1.5. Síntesis de los intermedios de *N*-(2-cloro-4-nitrobencil)dialquilamina **2m-o** a partir de una secuencia de dos reacciones de 2-cloro-4-aminotolueno **1d**

Para la preparación de los tres nuevos intermedios **2m-o** se planteó una ruta de tres pasos a partir del reactivo comercial de 2-cloro-4-aminotolueno tal como se muestra en el **Esquema 3**.



Esquema 3. Ruta de síntesis para preparar a los intermedios **2m-o**.

4.1.2.1.1.5.1. Oxidación del grupo amino en el 2-cloro-4-aminotolueno **1d** para dar el 2-cloro-4-nitrotolueno **1e** ^[27a]



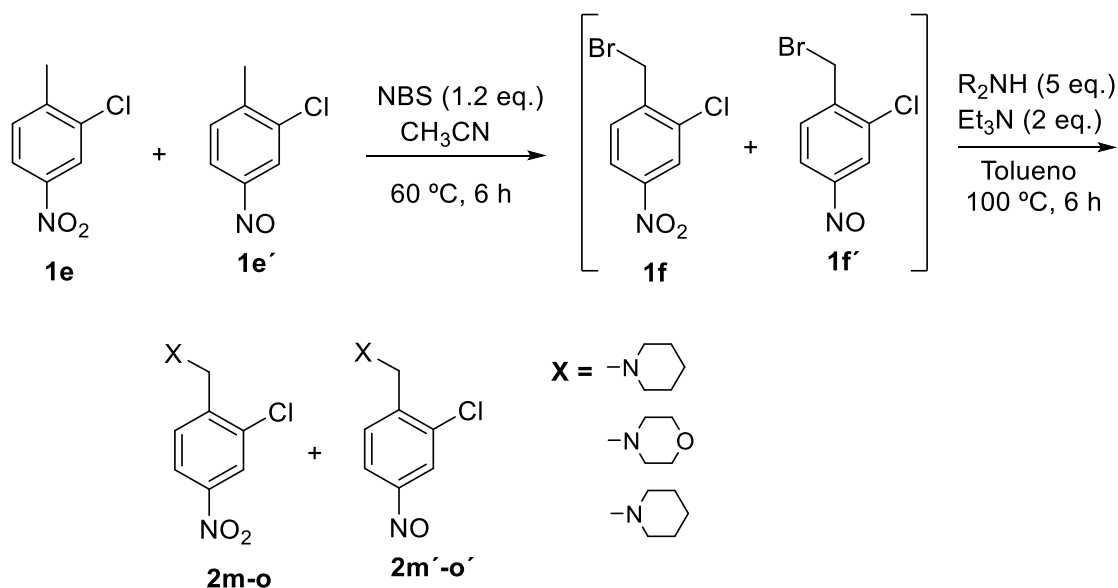
En un balón fondo redondo (25 mL), se colocó el 2-cloro-4-aminotolueno **1d** (1.0 g, 0.0035 mol, 1 eq.) y una solución de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.18 g, 0.0042 mol, 1.2 eq.) disuelto en 10 mL de agua destilada. Seguidamente, se agregó oxono (2.58 g, 0.0042 mol, 1.2 eq.) y se dejó en agitación por 20 minutos a temperatura ambiente y se siguió por *TLC* empleando una mezcla *n*-hexano/acetato de etilo (8:2). Al culminar la reacción se realizó una extracción líquido-líquido utilizando diclorometano (4×50 mL) como disolvente extractor. Se justó la fase orgánica, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente bajo presión reducida, obteniendo un sólido marrón. La mezcla resultante se recrystalizó utilizando *n*-heptano, obteniendo un sólido amarillo correspondiente a la mezcla de compuestos de oxidación nitrado y nitroso **1e** y **1e'** (1:1 de ^1H -RMN), lo que corresponde a un porcentaje de conversión de la 2-cloro-4-aminotolueno a productos de oxidación del 67% (0.74 g de masa total de mezcla).

Datos espectroscópicos:

1-(Bromometil)-2-cloro-4-nitrobenceno (1e): $R_f = 0.9$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.31 (m, 1H), 8.08 (d, $J = 8.0$; 3.1, 1H), 7.37 (d, $J = 8.0$, 1H), 2.47 (s, 3H).

1-(Bromometil)-2-cloro-4-nitrosobenceno (1e'): $R_f = 0.85$ (*n*-hexano/AcOEt 8:2). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.31 (m, 1H), 7.96 (d, $J = 8.0$; 3.1, 1H), 7.33 (d, $J = 8.0$, 1H), 2.44 (s, 3H).

4.1.2.1.1.5.2. Preparación de derivados de bencil-amino **2m-o** y su análogo **2m'-o'** vía bromación bencílica ^[10c, 23].



En un balón fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se colocó la mezcla **1e-1e'** (0.5 g, 0.0032 mol, 1 eq.) disuelto en acetonitrilo. Seguidamente, se agregó *N*-bromosuccinimida (0.684 g, 0.0039, 1.2 eq.). Esta mezcla se llevó a reflujo a una temperatura de $80\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas bajo agitación constante, radiación continua de luz *LED* blanca (10 watts) y se siguió por *TLC* empleando una mezcla *n*-hexano/acetato de etilo (8:2). Al culminar la reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, filtrando luego la mezcla de reacción, aislando un sólido blanco correspondiente a la succinimida, y el solvente del filtrado resultante fue eliminado por presión reducida obteniendo una masa de 0.62 g del producto de monobromación bencílica verificado por *TLC*. Posteriormente, la mezcla ($\sim 0.10\text{ g}$, 0.0004 mol, 1 eq.) se colocó en un balón de fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador y se disolvió en tolueno (3 mL). Seguidamente, se añadió trietilamina (0.0004 mol, 2 eq.), calentándolo a $100\text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente se agregó la dialquilamina correspondiente (0.002 mol, 5 eq.) gota a gota llevando la mezcla a reflujo por 6

horas bajo agitación constante. El avance de la reacción se siguió por *TLC* utilizando una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (8:2) como fase móvil. Pasadas tres horas la reacción se consideró completada, determinada mediante análisis de *TLC*. Al culminar la reacción, se deja enfriar a temperatura ambiente, se colocó sobre la mezcla de tolueno una solución de HCl (10 mL, 5M). Este proceso de extracción se repitió tres veces sobre el tolueno, se mezcló las soluciones acuosas y se neutralizó a *pH* básico (~9-10). Sobre la solución neutralizada se realizó extracciones con diclorometano (3 × 50 mL), se separó la fase orgánica, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó bajo presión reducida para dar un sólido o aceite naranja o rojizo, según sea el caso. Los productos aislados fueron reportados como la mezcla del derivado nitrado y nitroso, **2m-o** y **2m'-o'**. Datos detallados de las reacciones, estado físico, puntos de fusión se pueden encontrar en la **Tabla 5**. Estos intermedios fueron analizados por ¹H-RMN y ¹³C-RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo) y se probó que se encontraba bajo la forma nitro y nitroso, que son conveniente para el posterior paso de reducción para obtener la correspondiente anilina **3m-o**.

Tabla 5. Datos experimentales para la reacción de síntesis de *N*-(2-cloro-4-nitrobenzil)dialquilaminas **2m-o** a partir de 1-(bromometil)-2-cloro-4-nitrobenzeno **1f/1f'**.

Comp.	X	1f-1f' g (mmol)	Et ₃ N g (mmol)	R ₂ NH g (mmol)	2m-o g (%conversión)	Aspecto
2m	Piperidina	0.050 (0.2)	0.0405 (0.4)	0.085 (1.0)	0.044 (87)	Aceite amarillo
2n	Morfolina	0.050 (0.2)	0.0405 (0.4)	0.087 (1.0)	0.048 (94)	Aceite amarillo
2°	Pirrolidina	0.050 (0.2)	0.0405 (0.4)	0.071 (1.0)	0.038 (79)	Aceite amarillo

Datos espectroscópicos:

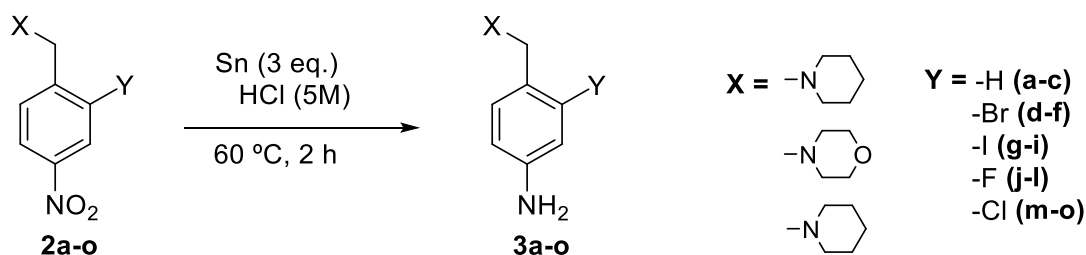
2m/m': aceite naranja, 44 mg mezcla (~ 50:50), *R_f*=0.35 (*n*-hexano/AcOEt 8:2): **1-(2-Cloro-4-nitrobenzil)piperidina (2m)**: *R_f*=0.35 (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (m, 1H), 8.16 (d, J= 8.0; 3.1, 1H), 7.70 (d, J = 8.0, 1H), 3.75 (s, 2H), 2.49 (s, 4H), 1.63 (t, 4H), 1.47 (m, 2H). **1-(2-Cloro-4-nitrosobenzil)piperidina (2m')**: ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (m, 1H), 8.11 (d, J= 8.0; 3.1, 1H), 7.64 (d, J = 8.0, 1H), 3.74 (s, 2H), 2.49 (s, 4H), 1.63 (t, 4H), 1.47 (m, 2H).

2n/n': aceite naranja, 48 mg mezcla (~ 50:50), *R_f*=0.35 (*n*-hexano/AcOEt 8:2): **1-(2-Cloro-4-nitrobenzil)morfolina (2n)**: *R_f*=0.35 (*n*-hexano/AcOEt 8:2). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.31 (m, 1H), 8.02 (d, J= 8.0; 3.1, 1H), 7.69 (d, J = 8.0, 1H), 3.75 (t, 4H), 3.66 (s, 2H), 2.54 (t, 3H). **1-**

(2-Cloro-4-nitrosobencil)morfolina (2n'): ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.31 (m, 1H), 8.08 (d, $J = 8.0$; 3.1, 1H), 7.37 (d, $J = 8.0$, 1H), 3.75 (t, 4H), 3.68 (s, 2H), 2.54 (t, 3H).

2o/o': aceite naranja, 38 mg mezcla ($\sim 50:50$), $R_f = 0.35$ (n -hexano/AcOEt 8:2): **1-(2-Cloro-4-nitrobencil)pirrolidina (2o)**: $R_f = 0.35$ (n -hexano/AcOEt 8:2). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.31 (m, 1H), 8.02 (d, $J = 8.0$; 3.1, 1H), 7.61 (d, $J = 8.0$, 1H), 3.86 (t, 4H), 2.61 (s, 2H), 1.82 (t, 3H). **1-(2-Cloro-4-nitrosobencil)pirrolidina (2o')**: ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.31 (m, 1H), 8.09 (d, $J = 8.0$; 3.1, 1H), 7.36 (d, $J = 8.0$, 1H), 3.83 (t, 4H), 2.61 (s, 2H), 1.82 (t, 3H).

4.1.2.1.2. *Síntesis de intermedios de anilinas, 4-(dialquilaminometil)-2-substituted anilina 3a-o y 3e' a partir de la reducción de grupo nitro en las 4-(dialquilaminometil)-4-nitrobencilaminas 2a-o y 2e'*^[10c, 27b]



En un balón fondo redondo de 10 mL provisto de un condensador, se colocó la *N*-(4-nitrobencil)dialquilamina sustituida **2a-o o 2e'** (1 eq.) correspondiente, estaño sólido (3 eq) y HCl concentrado (0.5 mL). Esta mezcla se calienta a una temperatura de 60 °C por 2 horas bajo agitación constante y es seguida por *TLC*. Durante el transcurso de la reacción se aprecia la formación de un sólido. Al culminar, se deja enfriar a temperatura ambiente, neutraliza con adición de una solución de NaOH al 10% muy lentamente. Finalmente, la solución resultante se extrae con diclorometano, y se seca con MgSO_4 anhidro, luego se filtra y evapora el solvente, obteniendo la anilina correspondiente **3a-o**. Datos detallados de las reacciones, estado físico se pueden encontrar en la **Tabla 6**. Estos intermedios, nuevos desde **3d a 3o y 3e'**, fueron debidamente caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y para algunos casos ^{19}F -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo). Los espectros de **3a-c** se pueden encontrar en detalle en referencia previa [10^c].

Tabla 6. Datos experimentales para la reacción de síntesis de 4-(dialquilaminometil)anilinas **3a-o** y **3e'** a partir de las *N*-(4-nitrobencil)dialquilaminas **2a-o** y **2e'**.

Comp.	X, Y	2a-o g (mmol)	Sn g (mmol)	3a-o g (%R)	Aspecto
3a	Piperidina, H	0.106 (0.45)	0.119 (1.35)	0.075 (88)	Aceite amarillo
3b	Morfolina, H	0.501 (2.25)	0.849 (6.75)	0.306 (87)	Aceite anaranjado
3c	Pirrolidina, H	0.101 (0.49)	0.162 (1.45)	0.0715 (84)	Aceite amarillo
3d	Piperidina, Br	0.100 (0.33)	0.117 (0.99)	0.0717 (80)	Aceite amarillo
3e	Morfolina, Br	0.060 (0.20)	0.070 (0.60)	0.050 (92)	Aceite amarillo
3f	Pirrolidina, Br	0.100 (0.35)	0.125 (1.05)	0.0744 (84)	Aceite amarillo
3g	Piperidina, I	0.095 (0.27)	0.098 (0.82)	0.067 (77)	Aceite amarillo
3e'	Morfolina, diBr	0.060 (0.16)	0.0556(0.48)	0.035 (62)	Aceite amarillo
3h	Morfolina, I	0.0144(0.04)	0.0135(0.11)	0.0097 (73)	Aceite amarillo
3i	Pirrolidina, I	0.075 (0.23)	0.081 (0.68)	0.048 (71)	Aceite amarillo
3j	Piperidina, F	0.053 (0.22)	0.079 (0.67)	0.040 (88)	Aceite amarillo pálido
3k	Morfolina, F	0.031 (0.13)	0.046 (0.39)	0.0176 (65)	Aceite amarillo pálido
3l	Pirrolidina, F	0.064 (0.29)	0.102 (0.86)	0.042 (77)	Aceite amarillo pálido
3m	Piperidina, Cl	0.024 (0.11)	0.042 (0.37)	0.0124 (52)	Aceite naranja
3n	Morfolina, Cl	0.025 (0.12)	0.043 (0.38)	0.0114 (48)	Aceite rojizo
3o	Pirrolidina, Cl	0.023 (0.11)	0.042 (0.37)	0.0221 (77)	Aceite amarillo

Datos espectroscópicos:

3-Bromo-4-(piperidinometil)anilina (3d): aceite amarillo, 72 mg (rendimiento 80%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.17 (m, 1H), 6.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 3.47 (s, 2H), 2.43 (t, J = 5.4 Hz, 4H), 1.57 (t, J = 5.6 Hz, 4H), 1.43 (t, J = 6.1 Hz, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 146.29, 131.72, 127.26, 125.30, 118.62, 114.21, 61.80, 54.36, 25.98, 24.39.

3-Bromo-4-(morfolinometil)anilina (3e): aceite amarillo, 50.0 mg (rendimiento 92%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.17 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 3.78 (m, 4H), 3.49 (s, 2H), 2.57 (m, 4H).

3-Bromo-4-(pirroldinometil)anilina (3f): aceite amarillo, 74 mg (rendimiento 84%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.20 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 2.64 (m, 4H), 1.85 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 144.34, 129.47, 125.84, 122.81, 116.61, 112.24, 56.71, 51.92, 21.49.

3,5-Dibromo-4-(morfolinometil)anilina (3e'): aceite amarillo, 35.0 mg (rendimiento 62%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.47 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 3.75 (m, 4H), 3.47 (s, 2H), 2.50 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 144.11, 134.21, 124.00, 118.85, 108.15, 67.00, 61.18, 53.35.

3-Iodo-4-(piperidinometil)anilina (3g): aceite amarillo, 9.7 mg (rendimiento 73%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.18 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.28$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 1H), 3.34 (s, 1H), 2.39 (m, 4H), 1.50 (t, $J = 10.8, 4.7$ Hz, 4H), 1.37 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 143.99, 128.59, 123.10, 112.71, 64.15, 52.09, 27.51, 23.74, 22.18.

3-Iodo-4-(morfolinometil)anilina (3h): aceite amarillo, 50.0 mg (rendimiento 92%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.19 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 1H), 3.61 (s, 2H), 2.55 (4H), 1.81 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 130.77, 125.22, 115.22, 62.98, 53.65, 53.55, 29.72, 23.50, 23.41.

3-Iodo-4-(pirrolidinometil)anilina (3i): aceite amarillo, 74 mg (rendimiento 84%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.17 (m, 2H), 6.69 (m, 1H), 3.61 (s, 2H), 2.63 (m, 4H), 1.79 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 146.39, 130.83, 125.22, 115.13, 100.98, 63.31, 53.85, 29.72, 23.56.

3-Flúor-4-(piperidinometil)anilina (3j): aceite amarillo, 40 mg (rendimiento 88%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.08 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.38 (m, 2H), 3.44 (s, $J = 1.5$ Hz, 2H), 1.56 (p, $J = 5.6$ Hz, 4H), 1.40 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 161.08, 158.65, 144.79, 130.34, 111.83, 108.12, 99.53, 53.26, 51.49, 23.54. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -116.73.

3-Flúor-4-(morfolinometil)anilina (3k): aceite amarillo, 17.6 mg (rendimiento 66%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.08 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.42 (m, 2H), 3.75 (m, 4H), 3.46 (s, $J = 1.4$ Hz, 2H), 2.45 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 163.50, 147.48, 132.6, 113.39, 110.59, 101.98, 67.00, 55.46, 53.14, 29.71. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -117.28.

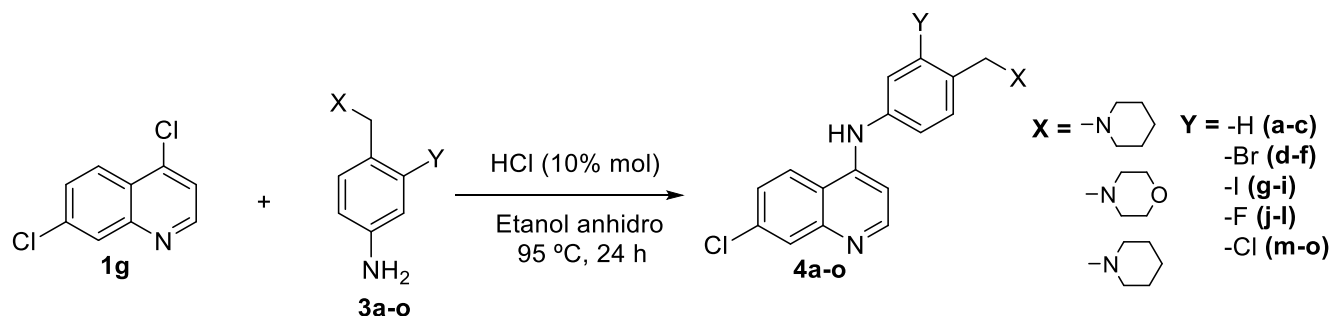
3-Flúor-4-(pirrolidinometil)anilina (3l): aceite amarillo, 42 mg (rendimiento 77%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.11 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.45 (m, 2H), 3.58 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H), 2.52 (d, $J = 6.3$ Hz, 4H), 1.77 (p, $J = 3.2$ Hz, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 132.38, 110.62, 102.00, 101.75, 53.63, 52.23, 29.71, 23.37. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -117.34.

3-Cloro-4-(piperidinometil)anilina (3m): aceite amarillo, 12 mg (rendimiento 52%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.24 (d, 1H), 6.68 (d, $J = 3.0$, 1H), 6.54 (m, 1H), 3.54 (s, 2H), 2.49 (s, 4H), 1.58 (m, 4H), 1.48 (m, 2H).

3-Cloro-4-(morfolinometil)anilina (3n): aceite amarillo, 11.6 mg (rendimiento 48%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.10 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 3.0$, 1H), 6.48 (dd, $J = 8.0$; 3.0, 1H), 3.62 (t, 4H), 3.46 (s, 2H), 2.42 (t, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 145.50, 134.2, 130.96, 123.88, 114.46, 112.39, 65.90 (2C), 58.07, 52.33 (2C).

3-Cloro-4-(pirrolidinometil)anilina (3o): aceite amarillo, 22 mg (rendimiento 77%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.11 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.45 (m, 2H), 3.58 (d, 2H), 2.52 (d, $J = 6.3$ Hz, 4H), 1.77 (p, $J = 3.2$ Hz, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 132.38, 110.62, 102.00, 101.75, 53.63, 52.23, 29.71, 23.37.

4.1.2.1.3. Síntesis de 7-cloro-*N*-(4-(dialquilaminometil)fenil)quinolin-4-amina sustituidas **4a-o** a partir de 4,7-dicloroquinolina y 4-(dialquilaminometil)anilina sustituidas **3a-o** [10c, 28]



En un balón de 10 mL provisto de un condensador, se colocó 4,7-dicloroquinolina **1g** (1 eq) disuelta en etanol y dos gotas de HCl concentrado, seguida de la adición de la bencilamino anilina **3a-o** correspondiente (1.1 eq) disuelta en etanol. Luego, esta mezcla se calienta a reflujo por 24 horas bajo agitación constante y se sigue por TLC, empleando una mezcla *n*-hexano/AcOEt (1:1). Durante el transcurso de la reacción se aprecia la formación de un sólido. Al culminar, se deja a temperatura ambiente y el sólido resultante se filtra al vacío obteniendo 4-(4-((7-cloroquinolin-4-il)amino)bencil)dialquilamino-4-clorhidrato. La solución etanoica se evapora y se adiciona una solución de NaOH 20%, precipitando un sólido que se filtra al vacío y se purifica por cromatografía en columna en gradiente de polaridad, obteniendo la 4-amino-7-cloroquinolina **4a-o** correspondiente. Los derivados **4a-f** fueron obtenidos efectivamente (ver detalles en **Tabla 7** abajo), mientras que sólo un derivado fluorado **4k** (derivado de la reacción con la anilina **3k**) y un derivado clorado **4h** (derivado de la reacción con la anilina **3n**) fueron obtenidos, dando en más de los casos productos colaterales tales como 4-etoxiquinolina y 4-hidroxiquinolina (en baja proporción) que demuestra la poca reactividad de estas anilinas frente a la sustitución nucleofílica

aromática (S_NAr). Las reacciones con las anilinas iodadas **3g-i** y la anilina dibromada **3e** no avanzaron. Datos detallados de las reacciones, estado físico, puntos de fusión se pueden encontrar en la **Tabla 7**. Estos nuevos productos finales de isoquinas deshidroxiladas fueron debidamente caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y algunos casos ^{19}F -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 7. Datos experimentales para la reacción de síntesis de 7-cloro-*N*-(4-(dialquilaminometil)fenil)quinolin-4-aminas **4a-f**, **4k** y **4n** a partir de 4,7-dicloroquinolina **1g** y la correspondiente 4-(dialquilaminometil)anilinas **3a-f**, **3k** y **3n**.

Comp.	X, Y	3a-o g (mol)	1g g (mol)	4a-h g (%R)	Aspecto	P.f. (°C)
4a	Piperidina, H	0.050 (0.26)	0.043 (0.22)	0.043 (55)	Sólido blanco	194.5-196.0
4b	Morfolina, H	0.072 (0.38)	0.0675 (0.34)	0.105 (88)	Sólido blanco	194.8-195.6
4c	Pirrolidina, H	0.050 (0.28)	0.0468 (0.24)	0.066 (82)	Sólido beige	195.0-195.8
4d	Piperidina, Br	0.050 (0.19)	0.0305 (0.15)	0.0575 (87.0)	Sólido beige	154.0-154.4
4e	Morfolina, Br	0.0554 (0.20)	0.0366 (0.19)	0.0297 (37.3)	Sólido amarillo	244.5-245.0
4f	Pirrolidina, Br	0.050 (0.20)	0.0322 (0.16)	0.041 (60.6)	Sólido amarillo	155.9- 160.5
4k	Morfolina, F	0.025 (0.13)	0.022 (0.11)	0.021 (67)	Sólido amarillo	N.D.
4n	Morfolina, Cl	0.021 (0.10)	0.019 (0.10)	0.022 (76)	Sólido amarillo	N.D.
N.D.: No determinado						

Datos espectroscópicos:

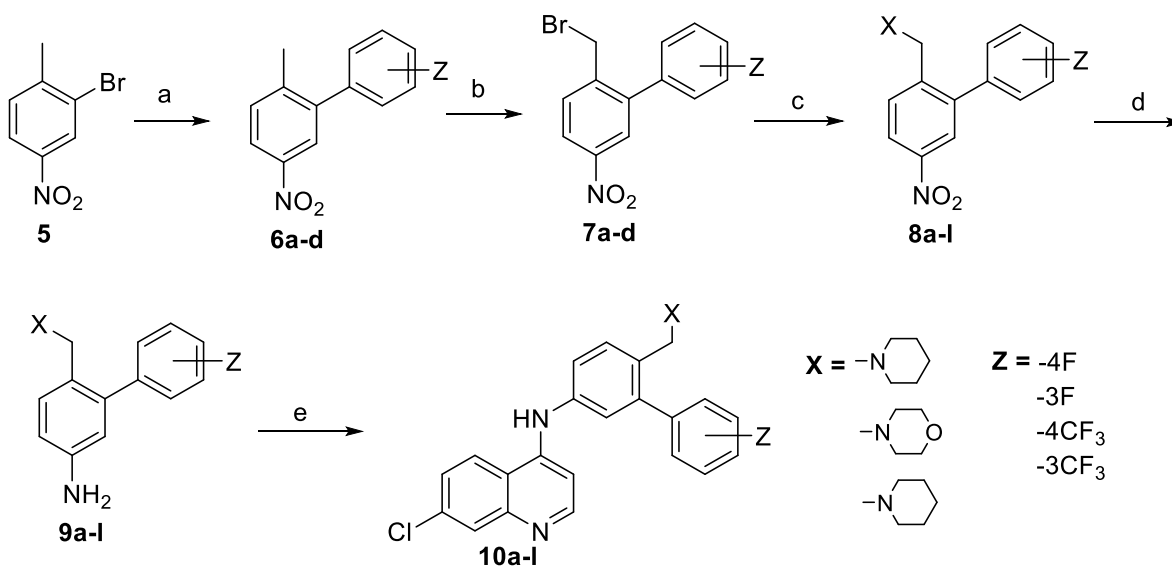
a) 7-Cloro-*N*-(4-(piperidin-1-ilmetil)fenil)quinolin-4-amina (4a):

- Forma neutra:** sólido blanco, 43 mg (rendimiento 55.4%). P.f.: 194.8- 195.6 °C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.52 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.42 (m, 1H), 7.93 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 7.44 – 7.32 (m, 4H), 7.00 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.47 (s, 2H), 2.40 (m, 4H), 1.58 (p, J = 5.5 Hz, 4H), 1.46 (d, J = 6.0 Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, acetone- d_6) δ 151.04, 149.66, 148.84, 139.37, 135.42, 130.99, 126.42, 125.38, 123.34, 122.86, 101.40, 62.46, 56.94, 53.76, 24.82, 23.53 (d, J = 6.2 Hz), 16.99.
- Forma clorhidrato:** sólido amarillo. P.f.: 194.8- 195.6 °C. ^1H -RMN (400 MHz, D_2O): δ 8.27 (m, 1H), 8.21 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.99 (m, 1H), 7.69 (d, J = 7.8, 1H), 7.59 (d, J = 8.0, 2H), 7.50 (d, J = 8.0, 2H), 6.91 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.43 (m, 4H), 2.93 (t, 4H),

- 1.89 (m, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, D_2O): δ 155.6, 142.53, 139.9, 138.7, 138.2, 132.9, 128.2, 128.1, 125.7, 124.3, 119.3, 116.0, 100.4, 59.8, 52.8, 22.7, 21.1.
- b) **7-cloro-N-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-amina (4b)**: (forma neutra), sólido blanco, P.f.: 194.8-195.6°C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.36 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 7.32-7.23 (m, 4H), 6.83 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H).
- c) **7-cloro-N-(4-(pirrolidinometil)fenil)quinolin-4-amina (4c)**: sólido amarillo, P.f.: 195.0-195.8°C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.52 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 8.0, 1H), 7.93 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 8.0, 2H), 7.33 (d, J = 8.0, 2H), 6.99 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.63 (s, 2H), 2.53 (m, 4H), 1.77 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, acetone- d_6): δ 152.0, 150.2, 148.3, 138.8, 136.2, 134.3, 129.6, 128.3, 125.0, 123.4, 122.7, 118.5, 101.8, 59.5, 53.7, 23.1.
- d) **7-Chloro-N-(3-bromo-4-(piperidinometil)fenil)-7-cloroquinolin-4-amina (4d)**: sólido amarronado, P.f.: 154.0-154.5°C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.52 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 8.0, 1H), 7.93 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 8.0, 2H), 7.33 (d, J = 8.0, 2H), 6.99 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.63 (s, 2H), 2.53 (m, 4H), 1.77 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, acetone- d_6): δ 152.0, 150.2, 148.3, 138.8, 136.2, 134.3, 129.6, 128.3, 125.0, 123.4, 122.7, 118.5, 101.8, 59.5, 53.7, 23.1.
- e) **7-Chloro-N-(3-bromo-4-(morfolinometil)fenil)-7-cloroquinolin-4-amina (4e)**: (forma diprotonada): sólido amarillo, P.f.: 244.5-245.0°C. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.93 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 5.3, 1H), 8.34 (m, 1H), 8.22 (d, J = 2.5, 1H), 7.92 (m, 2H), 7.66 (d, J = 8.0, 1H), 7.04 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.52 (s, 2H), 3.91 (m, 4H), 3.27 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, acetone- d_6): δ 154.9, 144.5, 141.4, 139.7, 139.1, 133.4, 129.4, 128.21, 128.17, 126.7, 126.5, 124.7, 120.0, 116.8, 101.7, 79.6, 59.5, 53.7, 23.1.
- f) **7-Chloro-N-(3-bromo-4-(pirrolidinometil)fenil)-7-cloroquinolin-4-amina (4f)**: sólido amarillo, P.f.: 155.9-160.5°C. ^1H -RMN (400 MHz, D_2O): δ 8.28 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.22 (q, J = 8.3 Hz, 1H), 7.92 – 7.81 (m, 1H), 7.75 (dd, J = 8.9, 3.3 Hz, 1H), 7.66 (dt, J = 8.4, 1.4 Hz, 2H), 7.53-7.43 (m, 1H), 7.00 (dd, J = 7.0, 1.3 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 3.56 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.31 – 3.21 (m, 2H), 2.31-1.86 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, D_2O) δ 142.85, 140.08, 139.37, 138.61, 133.81, 129.27 (d, J = 11.4 Hz), 128.33, 125.78, 124.57 (d, J = 2.4 Hz), 124.23, 119.35, 116.03, 100.85, 57.10, 54.25, 22.38.

- g) **7-Chloro-N-(3-flúor-4-(morfolinometil)fenil)-7-cloroquinolin-4-amina (4k)**: sólido blanco, P.f.: 155.9-160.5°C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.44 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.19 (dd, J = 9.0, 3.4 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.39 – 7.32 (m, 2H), 7.10 (dd, J = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 7.05 – 7.00 (m, 2H), 3.49 (dt, J = 9.6, 4.6 Hz, 4H), 3.43 (d, J = 1.3 Hz, 2H), 2.34 - 2.28 (m, 5H). ^{13}C NMR (101 MHz, acetone- d_6): δ 162.97 ($J_{\text{C-F}}$ = 245.5 Hz), 160.54, 151.91, 149.98, 147.46, 141.44, 134.57, 132.38 ($J_{\text{C-C-F}}$ = 6.03 Hz), 128.21, 125.43, 123.53, 118.86, 117.32, 108.56 ($J_{\text{C-C-F}}$ = 25.5 Hz), 103.09, 66.52 (2C), 54.97, 53.32 (2C).
- h) **7-Chloro-N-(3-cloro-4-(morfolinometil)fenil)-7-cloroquinolin-4-amina (4n)**: sólido blanco, P.f.: 155.9-160.5°C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.45 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.18 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.47-7.35 (m, 2H), 7.33-7.20 (m, 2H), 6.99 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 3.51 (t, 4H), 3.47 (s, 3H), 2.36 (t, J = 4.7 Hz, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, acetone- d_6): δ 163.86, 159.64, 152.14, 147.44, 143.36, 134.50, 131.80, 131.00, 128.39, 125.40, 123.44, 122.43, 120.34, 118.84, 102.93, 66.61, 59.03, 53.57.

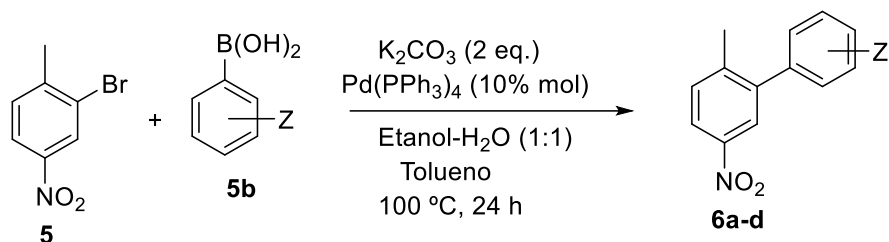
4.1.2.2 Síntesis de derivados de isotebuquina



Esquema 4. Ruta general para la síntesis de derivados deshidroxilados de isotebuquina **10a-l**. Condiciones de reacción: (a) **6a-d** (1 eq.), ArB(OH)₂ (1.1 eq.), K₂CO₃ (2 eq.), Pd(PPh₃)₄ (10% mol), etanol-H₂O (1:1), tolueno, 100 °C, 24 h; (b) **6a-d** (1 eq.), NBS (1.1 eq.), LED (13 W),

acetinitrilo, 60 °C, 6 h; (c) **7a-d** (1 eq.), dialquilamina (5 eq.), Et₃N (5 eq.), tolueno, 100 °C, 4-6 h; (d) **8a-l** (1 eq.), Sn (3 eq.), HCl, 60 °C, 2 h; (e) **9a-l** (1 eq.), 4,7-dicloroquinolina (1.1 eq.), HCl (cat.), etanol, 95 °C, 24h.

4.1.2.2.1. Síntesis de derivados de 2-aril-4-nitrotolueno **6a-d** a partir de 2-bromo-4-nitrotolueno **5** [10b,29]



En un balón fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se colocó 2-bromo-4-nitrotolueno **5** (1 eq.), disuelto en tolueno. Seguidamente, se agregó el correspondiente ácido fenilborónico **5b** (1,2 eq.), K₂CO₃ (2.0 eq.) disuelto en una solución agua/etanol (1:1) y el catalizador de Pd(PPh₃)₄ (10% mol). Esta mezcla se llevó a reflujo a una temperatura de 100 °C por 24 h bajo agitación constante, siguiéndola por *TLC* empleando una mezcla *n*-hexano/AcOEt (8:2). Al culminar la reacción, el solvente restante es eliminado mediante presión reducida quedando un sólido oscuro que es purificado por cromatografía en columna con *n*-hexano/AcOEt (9:1) como fase móvil para finalmente obtener el compuesto derivado de bifenilo **6a-d** deseado. Datos detallados de las reacciones, estado físico, puntos de fusión se pueden encontrar en la **Tabla 8**. Estos nuevos intermediarios fueron debidamente caracterizados por ¹H-RMN, ¹³C-RMN y ¹⁹F-RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 9. Datos experimentales para la reacción de síntesis de derivados de 2-aril-5-nitrotoluenos **6a-d** a partir de 2-bromo-4-nitrotoluenos **5**.

Comp.	X	5 g (mmol)	ArB(OH) ₂ g (mol)	K ₂ CO ₃ g (mol)	6a-d g (%R)	Aspecto	P.f. (°C)
6a	4'F	0.30 (1.4)	0.232 (1.7)	0.477 (3.4)	0.280 (88)	Sólido blanco	78.7-79.0
6b	3'F	0.30 (1.4)	0.232 (1.7)	0.477 (3.4)	0.255 (80)	Aceite incoloro	----
6c	4'CF ₃	0.30 (1.4)	0.262 (1.7)	0.477 (3.4)	0.186 (44)	Sólido blanco	81.2-81.8
6d	3'CF ₃	0.30 (1.4)	0.262 (1.7)	0.477 (3.4)	0.318 (82)	Sólido blanco	67.0-68.5

Datos espectroscópicos:

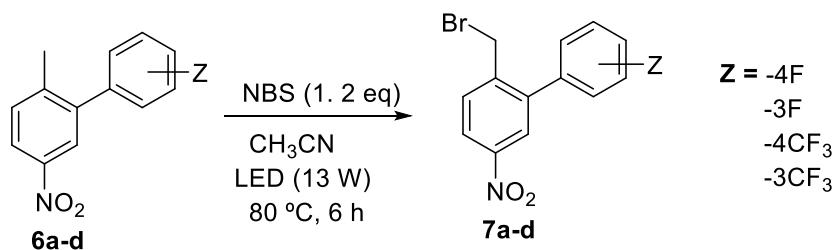
4'-Flúoro-2-metil-5-nitro-1,1'-bifenilo (6a): sólido blanco, 280 mg (rendimiento 88%). P.f.: 78.7- 79.0°C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.16 (m, 2H), 7.42 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.36 (m, 3H), 7.21 (m, 2H), 2.34 (s, 3H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 163.70, 161.24, 146.24, 143.54, 142.08, 135.52, 131.23, 130.69, 129.81, 124.66, 123.55, 122.27, 115.66. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -114.06.

3'-Flúoro-2-metil-5-nitro-1,1'-bifenilo (6b): aceite incoloro, 255 mg (rendimiento 80%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.17 (m, 3H), 7.44 (td, $J = 7.9, 5.9$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.17 (m, 2H), 7.00 (m, 1H), 2.36 (s, 3H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 163.86, 161.41, 146.24, 145.93, 143.39, 141.80, 131.31, 130.23, 124.76, 123.55, 122.52, 115.97, 114.80. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -112.54.

2-Metil-5-nitro-4'-(trifluorometil)-1,1'-bifenil (6c): sólido blanco, 186 mg (rendimiento 44%). P.f.: 81.2- 81.8°C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.17 (dd, $J = 8.4$ Hz, 2.5 Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.49 (m, 3H), 2.36 (s, 3H). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.61.

2-Metil-5-nitro-3'-(trifluorometil)-1,1'-bifenil (6d): sólido blanco, 318 mg (rendimiento 82%). P.f.: 67- 68.5 °C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.16 (dd, $J = 8.4, 2.5$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.52 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.36 (s, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 145.32, 144.92, 142.38, 140.52, 139.27, 131.31, 130.43, 128.80, 128.15, 124.76, 123.81, 123.59, 122.54, 121.76, 20.63. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.63.

4.1.2.2.2. Síntesis de bromuro de 2-aril-4-nitrobencilos **7a-d** a partir de 2-aril-4-nitrotoluenos **6a-d** [10b, 26]



En un balón fondo redondo (25 mL) provisto de un condensador, se colocó el 2-aril-4-nitrobencilos **6a-d** correspondiente (1 eq.) disuelto en acetonitrilo. Seguidamente, se agregó *N*-bromosuccinimida (1.2 eq.). Esta mezcla se llevó a reflujo a una temperatura de 80 °C por 6 horas

bajo agitación constante, radiación continua de luz *LED* blanca (10 watts) y se siguió por *TLC* empleando una mezcla *n*-hexano/acetato de etilo (8:2). Al culminar la reacción se dejó a temperatura ambiente, filtrando luego la mezcla de reacción, aislando un sólido blanco correspondiente a la succinimida, y el solvente del filtrado resultante fue eliminado por presión reducida quedando el producto de monobromación **7a-d** lo suficientemente puro como para el siguiente paso de reacción. Datos detallados de las reacciones, estado físico, puntos de fusión se pueden encontrar en la **Tabla 10**. Estos nuevos intermediarios fueron debidamente caracterizados por ^1H -RMN y ^{19}F -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 10. Datos experimentales para la reacción de síntesis de bromuro de 2-aril-4-nitrobencilos **7a-d** a partir de 2-aril-4-nitrotoluenos **6a-d**

Comp.	X	6a-d g (mmol)	NBS g (mol)	7a-d g (%conversión)	Aspecto
7a	4'F	0.15 (0.65)	0.137 (0.77)	0.208 (73)	Sólido anaranjado
7b	3'F	0.15 (0.65)	0.137 (0.77)	0.183 (76)	Aceite anaranjado
7c	4'CF ₃	0.088(0.31)	0.066 (0.37)	0.128 (27)	Sólido anaranjado
7d	3'CF ₃	0.15 (0.51)	0.113 (0.61)	0.205 (73)	Aceite anaranjado

Datos espectroscópicos:

2-(Bromometil)-4'-flúoro-5-nitro-1,1'-bifenilo (7a): sólido anaranjado, 208 mg (conversión 73%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.21 (dd, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 1H), 8.10 (dd, $J = 14.7, 2.5$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.25 (m, 2H), 4.42 (s, 2H). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -112.79.

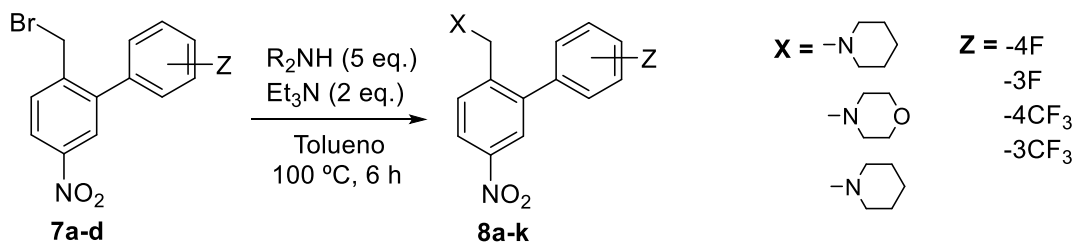
2-(Bromometil)-3'-Flúoro-2-metil-5-nitro-1,1'-bifenilo (7b): aceite anaranjado, 183 mg (conversión 76%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.25 (m, 1H), 8.12 (dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.18 (m, 2H), 4.43 (s, 2H). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -111.67.

2-(Bromometil)-5-nitro-4'-(trifluorometil)-1,1'-bifenilo (7c): aceite anaranjado, 128 mg (conversión 27%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.26 (dd, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 1H), 8.18 (m, 2H), 8.10 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.40 (s, 2H). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.69.

2-(Bromometil)-5-nitro-3'-(trifluorometil)-1,1'-bifenilo (7d): aceite anaranjado, 205 mg (conversión 73%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.26 (dd, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 2.4$

Hz, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.62 (m, 1H), 4.39 (s, 2H). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.68.

4.1.2.2.3. Síntesis de 2-(dialquilaminometil)-5-nitrobifenilos **8a-k** a partir de 2-(bromometil)-5-nitrobifenilos **7a-d** ^[10b,23]



En un balón de fondo redondo (10 mL) provisto de un condensador, se agregó 2-(bromometil)-5-nitrobifenilo **7a-d** (1 eq.), y se disolvió en tolueno (0.5 mL). Seguidamente, se añadió trietilamina (3 eq.), calentándolo a 100 °C. Posteriormente se agregó la dialquilamina correspondiente (5 eq.) gota a gota llevando la mezcla a reflujo por 6 horas bajo agitación constante. El avance de la reacción se siguió por *TLC* utilizando una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (8:2) como fase móvil. Pasadas seis horas la reacción se consideró completada, determinada mediante análisis de *TLC*. Al culminar la reacción, se deja enfriar a temperatura ambiente, y se le realizó una extracción ácido base, donde inicialmente se extrae del tolueno el producto aminado protonado con HCl al 15%, y luego se extrae con diclorometano habiendo neutralizado con hidróxido de sodio al 10%, con posterior secado de la fase orgánica aislando un aceite amarillo correspondiente al producto aminado **8a-k**. Datos detallados de las reacciones, estado físico, puntos de fusión se pueden encontrar en la **Tabla 11**. Estos intermedios fueron debidamente caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{19}F -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 11. Datos experimentales para la reacción de síntesis de 2-(dialquilaminometil)-5-nitrobifenilos **8a-k** a partir de 2-(bromometil)-5-nitrobifenilos **7a-d**

Comp.	X, Y	7a-d g (mol)	Et₃N g (mol)	R₂NH g (mol)	8a-k g (%R)	Aspecto
8a	4'F, Piperidina	0.05 (0.16)	0.048 (0.48)	0.070 (0.81)	0.0314 (62)	Aceite amarillo
8b	4'F, Morfolina	0.05 (0.16)	0.048 (0.48)	0.068 (0.81)	0.0337 (66)	Aceite amarillo
8c	4'F, Pirrolidina	0.05 (0.16)	0.048 (0.48)	0.057 (0.81)	0.0328 (68)	Aceite amarillo
8d	3'F, Piperidina	0.05 (0.16)	0.048 (0.48)	0.070 (0.81)	0.0382 (76)	Aceite amarillo

8e	3'F, Morfolina	0.05 (0.16)	0.048 (0.48)	0.068 (0.81)	0.0406 (80)	Aceite amarillo
8f	3'F, Pirrolidina	0.05 (0.16)	0.048 (0.48)	0.057 (0.81)	0.0412 (85)	Aceite amarillo
8g	4'CF ₃ , Piperidina	0.04 (0.11)	0.034 (0.33)	0.059 (0.56)	0.0404 (99)	Aceite amarillo
8h	4'CF ₃ , Morfolina	0.04 (0.11)	0.034 (0.33)	0.061 (0.56)	0.0232 (57)	Aceite amarillo
8i	4'CF ₃ , Pirrolidina	0.04 (0.11)	0.034 (0.33)	0.049 (0.56)	0.0322 (83)	Aceite amarillo
8j	3'CF ₃ , Piperidina	0.04 (0.11)	0.034 (0.33)	0.047 (0.56)	0.0369 (91)	Aceite amarillo
8k	3'CF ₃ , Morfolina	0.05 (0.14)	0.042 (0.42)	0.061 (0.70)	0.0434 (85)	Aceite amarillo

Datos espectroscópicos:

4-((4'-Flúoro-5-nitro-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)piperidina (8a): aceite amarillo , 32 mg (rendimiento 62%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.17 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.40 – 7.29 (m, 2H), 7.20 – 7.08 (m, 2H), 3.37 (s, 2H), 2.28 (m, 4H), 1.53 (p, *J* = 5.6 Hz, 4H), 1.41 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -114.01.

4-((4'-Flúoro-5-nitro-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)morfolina (8b): aceite amarillo, 34 mg (rendimiento 66%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.46 (m, 2H), 7.20 (m, 2H), 3.67 (t, 4H), 3.43 (s, 2H), 2.36 (dd, 4H). ¹⁹F-RMN (376 MHz, CDCl₃): δ -113.80.

4-((4'-Flúoro-5-nitro-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)pirrolidina (8c): aceite amarillo , 33 mg (rendimiento 68%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.18 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.42-7.32 (m, 2H), 7.19-7.10 (m, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.48-2.40 (m, 4H), 1.75 (p, *J* = 3.1 Hz, 4H). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 143.81, 140.93, 129.98, 129.90, 129.47, 123.76, 121.11, 114.38, 114.17, 56.12, 52.91, 28.64. ¹⁹F-RMN (376 MHz, CDCl₃): δ -114.01.

4-((3'-Flúoro-5-nitro-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)piperidina (8d): aceite amarillo , 38 mg (rendimiento 76%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.17 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 3.37 (s, 2H), 2.29 (m, 4H), 1.53 (m, 4H), 1.40 (m, 2H). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 163.69, 146.59, 144.44, 142.23, 141.22, 130.78, 129.49, 124.68, 123.43, 122.28, 116.61, 114.73, 60.25, 54.39, 26.01, 24.20. ¹⁹F-RMN (376 MHz, CDCl₃): δ -112.90.

4-((3'-Flúoro-5-nitro-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)morfolina (8e): aceite amarillo , 41 mg (rendimiento 80%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 3.66 (m, 4H), 3.43 (s,

2H), 2.36 (dd, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 163.69, 146.69, 143.10, 130.86, 129.97, 129.54, 125.06, 123.58, 122.35, 116.53, 115.12, 66.95, 59.85, 53.33, 29.71. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -112.68.

4-((3'-Flúoro-5-nitro-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)pirrolidina (8f): aceite amarillo , 41 mg (rendimiento 85%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.18 (dd, J = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 3.57 (s, 2H), 2.45 (m, 4H), 1.75 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 130.61, 129.92, 124.68, 122.45, 116.62, 116.40, 115.02, 114.81, 77.23, 57.12, 53.94, 23.60. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -112.74.

1-((5-Nitro-4'-(triflúorometil)-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)piperidina (8g): aceite amarillo , 40 mg (rendimiento 99%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.21 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.37 (s, 2H), 2.28 (t, 4H), 1.52 (m, 4H), 1.40 (m, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 146.21, 143.98, 141.63, 130.45, 129.20, 124.79, 124.22, 122.09, 59.83, 53.92, 25.55, 23.71. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.54.h

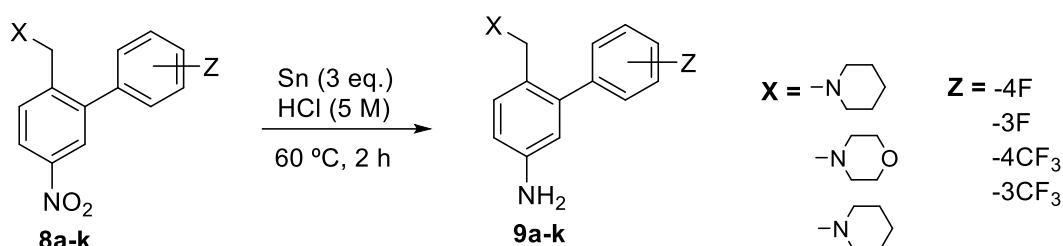
1-((5-Nitro-4'-(triflúorometil)-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)morfolina (8h): aceite amarillo , 23 mg (rendimiento 57%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.22 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.68 (m, 4H), 3.43 (s, 2H), 2.36 (t, J = 4.6 Hz, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 146.92, 143.08, 142.36, 130.96, 129.57, 125.38, 124.87, 122.63, 66.92, 59.88, 53.32. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -60.47.

1-((5-Nitro-4'-(triflúorometil)-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)pirrolidina (8i): aceite amarillo , 32 mg (rendimiento 83%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.22 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.46 (m, 4H), 1.76 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): 146.70, 142.70, 141.60, 130.82, 129.71, 125.42, 125.38, 125.34, 124.68, 122.73. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.56.

1-((5-Nitro-3'-(triflúorometil)-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)piperidina (8j): aceite amarillo , 37 mg (rendimiento 91%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.20 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.63 (m, 2H), 3.34 (s, 2H), 2.28 (t, 4H), 1.72 (m, 4H), 1.45 (m, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 146.81, 144.26, 142.30, 139.99, 132.57, 131.35, 130.52, 128.78, 126.34, 124.91, 124.73, 122.37, 60.52, 54.29, 24.20, 22.71. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.54.

1-((5-Nitro-3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-2-il)metil)morfolina (8k): aceite amarillo, 43 mg (rendimiento 57%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.70 (dd, $J = 7.9, 4.4$ Hz, 2H), 7.64 – 7.54 (m, 2H), 3.69 – 3.55 (m, 4H), 3.40 (s, 2H), 2.37 (t, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 144.63, 140.41, 140.15, 137.34, 130.03, 129.04, 128.13, 126.48, 123.87, 122.65, 122.40, 119.98, 64.42, 57.71, 50.77. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.54.

4.1.2.2.4. Reducción de derivados de 2-(dialquilaminometil)-5-nitro-bifenilos **8a-k** para dar los correspondientes intermedios de anilina **9a-k** ^[10b-c]



En un balón fondo redondo de 10 mL provisto de un condensador, se colocó la 2-(dialquilaminometil)-5-nitro-bifenilo **8a-k** (1 eq.) correspondiente, estaño sólido (3 eq.) y HCl concentrado (0.5 mL). Esta mezcla se calienta a una temperatura de 60 °C por 2 horas bajo agitación constante y es seguida por *TLC*. Durante el transcurso de la reacción se aprecia la formación de un sólido. Al culminar, se deja enfriar a temperatura ambiente, neutraliza con adición de una solución de NaOH al 10% muy lentamente. Finalmente, la solución resultante se extrae con diclorometano, y se seca con MgSO_4 anhidro, luego se filtra y evapora el solvente, obteniendo la anilina correspondiente **9a-k**. Datos detallados de las reacciones y estado físico se pueden encontrar en la **Tabla 12**. Estos nuevos intermedios fueron debidamente caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{19}F -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 12. Datos experimentales para la reacción de reducción de derivados de 2-(dialquilaminometil)-5-nitro-bifenilos **8a-k** para obtener anilinas **9a-k**.

Comp.	X, Y	8a-k g (mmol)	Sn g (mol)	9a-k g (%R)	Aspecto
9a	4'F, Piperidina	0.0314 (0.10)	0.035 (0.30)	0.0174 (84)	Aceite incoloro
9b	4'F, Morfolina	0.024 (0.08)	0.027 (0.23)	0.0134 (82)	Aceite incoloro
9c	4'F, Pirrolidina	0.0328 (0.11)	0.039 (0.33)	0.027 (78)	Aceite incoloro

9d	3'F, Piperidina	0.0310 (0.10)	0.035 (0.30)	0.026 (91)	Aceite incoloro
9e	3'F, Morfolina	0.0406 (0.13)	0.045 (0.39)	0.035 (95)	Aceite incoloro
9f	3'F, Pirrolidina	0.0412 (0.14)	0.048 (0.41)	0.029 (71)	Aceite incoloro
9g	4'CF ₃ , Piperidina	0.0404 (0.11)	0.040 (0.33)	0.020 (54)	Aceite incoloro
9h	4'CF ₃ , Morfolina	0.0232 (0.06)	0.022 (0.19)	0.020 (94)	Aceite incoloro
9i	4'CF ₃ , Pirrolidina	0.0322 (0.09)	0.032 (0.27)	0.020 (68)	Aceite incoloro
9j	3'CF ₃ , Piperidina	0.0369 (0.10)	0.036 (0.30)	0.025 (74)	Aceite incoloro
9k	3'CF ₃ , Morfolina	0.0434 (0.12)	0.042 (0.36)	0.021 (53)	Aceite incoloro

Datos espectroscópicos:

4'-Flúoro-6-(piperidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9a): aceite incoloro, 17 mg (rendimiento 84%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.45 (m, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.18 (m, 2H), 6.56 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.22 (s, 2H), 2.25 (m, 4H), 1.49 (m, 4H), 1.41 (m, 2H). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 161.53 (*J*=250 Hz), 143.35, 141.18, 136.06, 130.11, 129.47 (*J*=7.9 Hz) 124.31, 115.03, 112.98 (*J* =80 Hz), 112.37, 58.31, 52.26, 24.29, 22.76. ¹⁹F-RMN (376 MHz, CDCl₃): δ -116.33.

4'-Flúoro-6-(morfolin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9b): aceite incoloro, 13 mg (rendimiento 82%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (m, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.15 (m, 2H), 6.65 (dt, *J* = 8.3, 2.7 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.68 (m, 4H), 3.23 (s, 2H), 2.32 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 161.07 (*J* = 250 Hz), 143.08, 140.83, 135.40, 129.59, 128.80, 123.05, 114.64, 112.51, 111.73, 64.97, 57.74, 50.93. ¹⁹F-RMN (376 MHz, CDCl₃): δ -116.13.

4'-Flúoro-6-(pirrolidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9c): aceite incoloro, 27 mg (rendimiento 78%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.42(m, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.08 (m, 2H), 6.67 (dd, *J* = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.40 (s, 2H), 2.39 (ddd, *J* = 6.7, 4.0, 1.4 Hz, 4H), 1.70 (p, 4H). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 163.19 (*J* = 250 Hz), 144.92, 142.09, 137.63, 131.46, 126.93, 123, 116.58, 114.73 (*J*=80 Hz), 114.27, 56.74, 53.67, 23.44. ¹⁹F-RMN (376 MHz, CDCl₃): δ -116.26.

3'-Flúoro-6-(piperidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9d): aceite incoloro, 26 mg (rendimiento 91%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.33 (m, 1H), 7.29 (m, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.17 (dt, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 7.01 (tdd, *J* = 8.4, 2.7, 1.0 Hz, 1H), 3.20 (s, 2H), 2.25 (m, 4H), 1.53 (m, 4H), 1.38 (dt, *J* = 11.8, 5.5 Hz, 2H). ¹⁹F-RMN (376 MHz, CDCl₃): δ -114.26.

3'-Flúoro-6-(morfolin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9e): aceite incoloro, 35 mg (rendimiento 95%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (m, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.22 (m, 1H), 7.09 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.02 (tdd, $J = 8.5, 2.7, 1.0$ Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 8.3, 2.5$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 3.67 (m, 4H), 3.24 (s, 2H), 2.37 (m, 4H). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -114.14.

3'-Flúoro-6-(pirrolidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9f): aceite incoloro, 29 mg (rendimiento 71%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.35 (m, 1H), 7.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.22 (dt, $J = 10.2, 2.2$ Hz, 1H), 7.19 (m, 1H), 7.02 (dt, $J = 8.7, 4.4$ Hz, 1H), 6.68 (dd, $J = 8.2, 2.6$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.42 (s, 2H), 2.44 (m, 4H), 1.71 (m, 4H). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -113.99.

6-(Piperidin-1-ilmetil)-4'-(triflúorometil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9g): aceite incoloro, 20 mg (rendimiento 54%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.65 (m, 4H), 7.26 (s, 1H), 6.69 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.18 (s, 2H), 2.24 (s, 4H), 1.48 (p, $J = 5.6$ Hz, 4H), 1.37 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 144.15, 143.63, 140.94, 130.41, 128.44, 127.24, 123.24, 123.18, 121.61, 114.98, 112.95, 58.71, 52.52, 27.94, 23.03. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.28.

6-(Morfolin-1-ilmetil)-4'-(triflúorometil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9h): aceite incoloro, 20 mg (rendimiento 94%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.66 (m, 4H), 7.22 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.68 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.61 (t, 4H), 3.22 (s, 2H), 2.31 (t, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 144.34, 144.30, 141.47, 130.82, 129.12, 128.66, 127.91, 124.01, 123.54, 115.43, 113.20, 66.03, 58.83, 51.97. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.36 (d, $J = 29.5$ Hz).

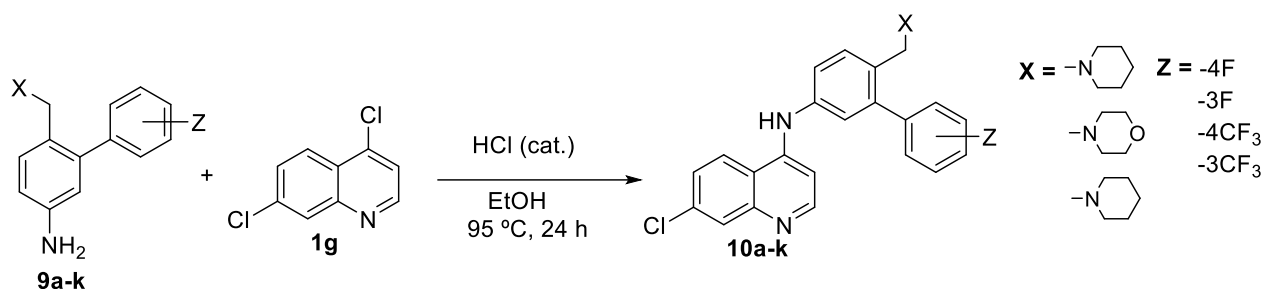
6-(Pirrolidin-1-ilmetil)-4'-(triflúorometil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9i): aceite incoloro, 20 mg (rendimiento 68%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.68 (m, 4H), 7.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.70 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.38 (s, 2H), 2.46 (m, 4H), 1.71 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 145.42, 145.07, 141.70, 131.44, 129.89, 128.78, 126.71, 124.73, 124.67, 116.29, 114.71, 56.73, 53.64, 23.44. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.10 (m).

6-(Piperidin-1-ilmetil)-3'-(triflúorometil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9j): aceite incoloro, 25 mg (rendimiento 74%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.93 (s, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.47 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 8.1, 2.5$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.15 (s, 2H), 2.26 (s, 4H), 1.59 (m, 4H), 1.38 (m, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 144.13, 141.42, 141.34,

131.65, 131.15, 129.01, 128.70, 126.92, 125.68, 124.97, 122.34, 115.52, 113.02, 59.36, 52.75, 28.56, 24.82. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.42.

6-(Morfolin-1-ilmetil)-3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-3-amina (9k): aceite incoloro, 21 mg (rendimiento 53%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.00 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 8.7, 6.8 Hz, 2H), 7.49 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.67 (dd, J = 8.1, 2.5 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 3.63 (t, 4H), 3.18 (s, 2H), 2.34 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 143.70, 140.74, 140.48, 130.72, 130.71, 130.48, 127.95, 126.28, 124.80, 123.13, 121.67, 114.86, 112.14, 65.16, 58.37, 51.07. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.41.

4.1.2.2.5. Síntesis de derivados de 7-cloro-*N*-(6-(dialquilamino)metil)bifenil-3-il)quinolin-4-aminas **10a-k** [10b, 28]



En un balón de 10 mL provisto de un condensador, se colocó 4,7-dicloroquinolina **1g** (1 eq.) disuelta en etanol y dos gotas de HCl concentrado, seguida de la adición de la anilina correspondiente **9a-k** (1.1 eq) disuelta en etanol. Luego, esta mezcla se calienta a reflujo por 24 horas bajo agitación constante y se sigue por *TLC*, empleando una mezcla *n*-hexano/acetato de etilo (1:1). Durante el transcurso de la reacción se aprecia la formación de un sólido. Al culminar, se deja a temperatura ambiente y el sólido resultante se filtra al vacío obteniendo el clorhidrato del producto de sustitución. La solución etanólica se evapora y sobre la mezcla resultante se adiciona una solución de NaOH 20%, precipitando un sólido que se filtra al vacío y se purifica por cromatografía en columna empleando un gradiente de polaridad, iniciando con una mezclas *n*-hexano/acetato de etilo de polaridad ascendente para ir aislando la 4,7-dicloroquinolina, seguido de contaminante de 4-etoxi-7-cloroquinolina hasta una acetato de etilo para ir aislando el producto de residuos de la anilina no reaccionante. El producto final **10a-k** fue obtenido como sólido de color blanco o amarillo. Datos detallados de las reacciones, estado físico, puntos de fusión se pueden encontrar en la **Tabla 13**. Estos nuevos derivados finales deshidroxilados de isotebuquinas fueron

debidamente caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{19}F -RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Tabla 13. Datos experimentales para la reacción de síntesis de derivados de 7-cloro-*N*-(6-(dialquilamino)metil)bifenil-3-il)quinolin-4-aminas **10a-k**.

Comp.	X, Y	9a-k g (mmol)	1g g (mmol)	10a-k g (%R)	Aspecto	P.f. (°C)
10a	4'F, Piperidina	0.030 (0.11)	0.025 (0.13)	0.0127 (23)	Sólido blanco	177.2-178.0
10b	4'F, Morfolina	0.030 (0.10)	0.025 (0.13)	0.021 (58)	Sólido marrón	165.3-165.8
10c	4'F, Pirrolidina	0.039 (0.14)	0.034 (0.17)	0.039 (63)	Sólido amarillo pálido	165.5-166.0
10d	3'F, Piperidina	0.026 (0.09)	0.021 (0.11)	0.013 (32)	Sólido amarillo pálido	185.7-186.4
10e	3'F, Morfolina	0.035 (0.12)	0.028 (0.15)	0.027 (50)	Sólido amarillo pálido	186.2- 187.0
10f	3'F, Pirrolidina	0.029 (0.10)	0.023 (0.12)	0.029 (69)	Sólido amarillo pálido	185.3-185.7
10g	4'CF ₃ , Piperidina	0.020 (0.06)	0.014 (0.07)	0.012 (41)	Sólido amarillo pálido	179.6-180.0
10h	4'CF ₃ , Morfolina	0.020 (0.06)	0.014 (0.07)	0.022 (75)	Sólido amarillo pálido	173.2- 173.6
10i	4'CF ₃ , Pirrolidina	0.02 (0.06)	0.014 (0.07)	0.013 (43)	Sólido blanco	183.2- 183.8
10j	3'CF ₃ , Piperidina	0.025 (0.07)	0.017 (0.10)	0.026 (70)	Sólido amarillo pálido	163-164
10k	3'CF ₃ , Morfolina	0.021 (0.06)	0.015 (0.08)	0.028 (90)	Sólido blanco	N/D

Datos espectroscópicos:

7-Cloro-*N*-(4'-flúoro-6-(piperidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina (10a): sólido blanco, 12.7 g (rendimiento 23%). P.f.: 177.2 -178.0°C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.40 (s, 1H), 8.23 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.44 (dd, J = 8.7, 5.8 Hz, 3H), 7.37 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.07 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 2.8, 1H, NH), 3.44 (s, 2H), 2.21 (m, 4H), 1.41 (m, 6H). ^{13}C -RMN (101 MHz, acetone- d_6): δ 163.35, 160.92, 151.97, 150.03, 147.92, 142.91, 139.19, 137.27, 134.46, 131.64, 129.42, 128.20, 125.22, 123.74, 123.47, 120.94, 114.72, 114.51, 102.30, 59.96, 53.84, 29.71, 24.10. ^{19}F -RMN (376 MHz, acetone- d_6): δ -117.20.

7-Cloro-*N*-(4'-flúoro-6-(morfolin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina (10b): sólido marrón, 27.0 g (rendimiento 58%). P.f.: 165.3 -165.8°C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.40 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H, NH), 8.22 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 8.7, 5.5 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 7.28 (dd, J = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 9.0, 9.1 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 5.2 Hz, 1H). ^{13}C -RMN (101 MHz, acetone- d_6): δ 163.36, 160.93, 152.03, 150.11, 147.95, 142.98, 139.35, 137.26,

134.42, 131.67, 131.34, 131.26, 128.29, 125.21, 123.81, 123.44, 120.86, 114.51, 102.33, 66.61, 59.90, 53.26. ^{19}F -RMN (376 MHz, acetone- d_6): δ -117.17.

7-Cloro-*N*-(4'-flúoro-6-(pirrolidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina (10c): sólido amarillo pálido, 39.0 g (rendimiento 63%). P.f.: 165.5 -166.0°C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.56 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.48 (m, 3H), 7.28 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.14 (m, 2H), 7.03 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.50 (m, 4H), 1.81 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 162.00, 159.55, 150.55, 148.28, 146.05, 141.13, 136.49, 135.13, 133.88, 132.22, 129.97, 129.67, 127.63, 124.70, 122.51, 120.00, 119.69, 116.65, 113.64, 113.43, 101.11, 55.53, 52.46, 22.08. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -115.28.

7-Cloro-*N*-(3'-flúoro-6-(piperidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina (10d): sólido amarillo pálido, 13.0 g (rendimiento 32%). P.f.: 185.7 -186.4.0°C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.58 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.46 (dd, J = 8.9, 2.2 Hz, 1H), 7.37 (td, J = 8.0, 5.9 Hz, 1H), 7.28 (dd, J = 5.4, 2.8 Hz, 1H), 7.21 (m, 2H), 7.07 (m, 2H), 6.65 (s, 1H), 3.35 (s, 2H), 2.34 (m, 4H), 1.54 (m, 4H), 1.42 (m, 2H). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -113.55.

7-Cloro-*N*-(3'-flúoro-6-(morfolin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina (10e): sólido amarillo pálido, 27.0 mg (rendimiento 50%). P.f.: 186.2-187.0°C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.58 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.38 (td, J = 8.0, 6.0 Hz, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.18 (t, J = 1.3 Hz, 1H), 7.10 (m, 2H), 6.73 (m, 1H), 3.68 (t, J = 4.7 Hz, 4H), 3.38 (s, 2H), 2.39 (d, J = 5.1 Hz, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 162.37 ($J_{\text{C-F}}$ = 244.4 Hz), 150.62, 146.06, 141.92 ($J_{\text{C-C-F}}$ = 1.8 Hz), 141.50 ($J_{\text{C-C-F}}$ = 7.8 Hz), 137.10, 134.20, 130.63, 130.59, 128.34 ($J_{\text{C-C-F}}$ = 8.4 Hz), 127.79, 125.03, 123.80 ($J_{\text{C-C-C-F}}$ = 2.8 Hz), 122.54, 119.98 ($J_{\text{C-C-F}}$ = 15.3 Hz), 116.85, 115.40 ($J_{\text{C-C-F}}$ = 21.9 Hz), 113.09 ($J_{\text{C-C-F}}$ = 20.9 Hz), 101.41, 65.83, 58.67, 51.97. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -114.63.

7-Cloro-*N*-(3'-flúoro-6-(pirrolidin-1-ilmetil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina (10f) (forma protonada): sólido amarillo pálido, 29.0 g (rendimiento 69%). P.f.: 185.3-185.7 °C. ^1H -RMN (400 MHz, D_2O): δ 8.29 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.68 (dd, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.42 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.24 (m, 3H), 6.97 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 4.43 (s, 2H), 3.35 (m, 2H),

2.77 (m, 2H), 1.81 (m, 1H). ^{13}C -RMN (101 MHz, D_2O): δ 162.95 ($J_{\text{C-F}} = 161.5$ Hz), 155.51, 143.83 ($J_{\text{C-C-C-F}} = 2.1$ Hz), 142.61, 139.97, 138.74, 137.93, 132.58, 130.81 ($J_{\text{C-C-C-F}} = 8.4$ Hz), 128.17, 127.40, 127.00, 125.48 ($J_{\text{C-C-C-F}} = 2.7$ Hz), 125.18, 124.31, 119.37, 116.49, 116.22, 116.04, 115.13 ($J_{\text{C-C-F}} = 21.1$ Hz), 100.59, 54.15, 53.80, 22.02. ^{19}F -RMN (376 MHz, D_2O): δ -112.68.

7-Cloro-N-(6-(piperidin-1-ilmetil)-4'-(trifluórometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina

(10g): sólido amarillo pálido, 12.0 g (rendimiento 41%). P.f.: 179.6-180.0 °C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.51 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.40 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.1, 2.6$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 6.59 (s, 1H), 3.27 (s, 2H), 2.25 (s, 4H), 1.48 (s, 4H), 1.35 (s, 2H). ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -62.95.

7-Cloro-N-(6-(morfolin-1-ilmetil)-4'-(trifluórometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina

(10h): sólido amarillo pálido, 22.0 g (rendimiento 75%). Punto de fusión: 173.2 – 173.6 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.49 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.40 (dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 3.59 (t, 4H), 3.30 (s, 2H), 2.31 (t, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 160.74, 155.61, 151.44, 149.73, 142.56, 141.32, 131.87, 130.25, 129.19, 127.98, 127.00, 124.73, 123.32, 122.08, 119.82, 119.59, 118.62, 116.31, 100.91, 65.36, 58.24, 51.53. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -62.95.

7-Cloro-N-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)-4'-(trifluórometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina

(10i): sólido amarillo pálido, 13 g (rendimiento 43%). Punto de fusión: 183.2 – 183.8 °C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.57 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.60 (t, $J = 7.7$ Hz, 3H), 7.47 (dd, $J = 8.9, 2.2$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 8.3, 2.5$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.51 (m, 4H), 1.76 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 151.58, 149.33, 146.94, 143.92, 141.76, 137.70, 134.98, 133.27, 131.16, 129.42, 129.15, 128.72, 125.83, 125.15, 124.62, 123.23, 121.43, 120.65, 117.70, 102.22, 56.57, 53.46, 23.13. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -62.95.

7-Cloro-N-(6-(piperidin-1-ilmetil)-3'-(trifluórometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina

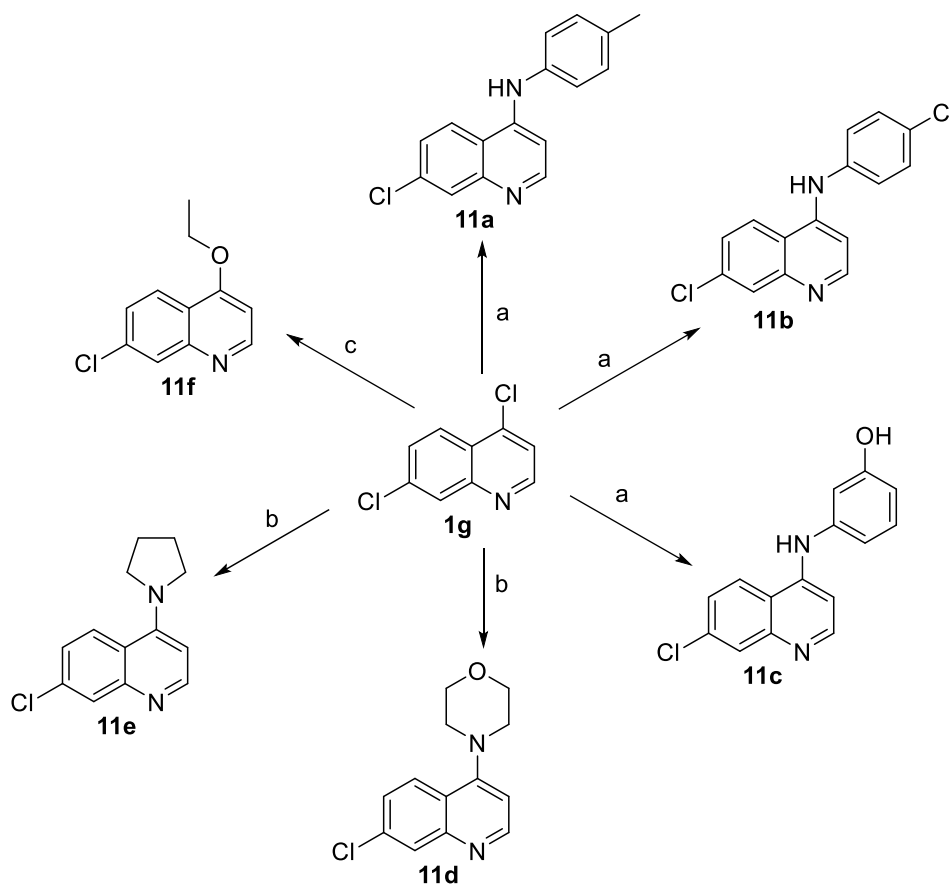
(10j), sólido amarillo pálido, 26.0 g (rendimiento 70%). P.f.: 163.6-164.0 °C. ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.41 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.81 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.57 (dt, $J = 15.3, 7.8$ Hz, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.32 (dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 3.19 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.23 (m, 4H), 1.39 (m, 4H), 1.33

(m, 2H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 152.41, 150.46, 148.27, 142.90, 142.53, 140.05, 134.83, 133.59, 133.58, 132.70, 129.84, 129.27, 128.66, 126.73, 125.63, 124.20, 124.16, 123.84, 121.47, 119.12, 102.84, 60.81, 54.13, 26.15, 24.58. ^{19}F NMR (376 MHz, acetone- d_6): δ -62.85.

7-Cloro-N-(6-(morfolin-1-ilmetil)-3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)quinolin-4-amina

(10k): sólido amarillo pálido, 28.0 g (rendimiento 90%). ^1H -RMN (400 MHz, acetone- d_6): δ 8.44 (m, 1H), 8.25 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.70 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.29 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 3.45 (t, 4H), 3.25 (s, 2H), 2.7 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 152.41, 150.46, 148.27, 142.90, 142.53, 140.05, 134.83, 133.59, 133.58, 132.70, 129.84, 129.27, 128.66, 126.73, 125.63, 124.20, 124.16, 123.84, 121.47, 119.12, 102.84, 60.81, 54.13, 26.15, 24.58. ^{19}F NMR (376 MHz, acetone- d_6): δ -62.13.

4.1.2.3 Síntesis de compuestos controles



Esquema 5. Ruta para preparación de derivados de grupo control **11a-f**. Condiciones de reacción: (a) **1g** (1 eq.), anilina correspondiente (1.2 eq.), HCl (cat.), etanol, 95 °C, 24 h. (b) **1g** (1 eq.), dialquilamina correspondiente (4 eq.), etanol, 95 °C, 24 h. (c) etanol, HCl (cat.), 95 °C, 24 h.

Procedimiento general: Para la preparación de las quinolinas **11a**, **11b** y **11c**, en un balón de 10 mL provisto de un condensador, se colocó 4,7-dicloroquinolina **1g** (1 eq.) disuelta en etanol y dos gotas de HCl concentrado, seguida de la adición de la anilina correspondiente (1.1 eq) disuelta en etanol siguiendo estrategia reportada con ligeras modificaciones ^[10b-c]. Para el caso de la preparación de los compuestos **11d** y **11e**, no se agregó la gota de HCl. Para el caso de la preparación de **11f**, no se utilizó ningún tipo de anilina o dialquilamina, solo el etanol actuando como disolvente y nucleófilo. Luego, la mezcla resultante se calienta a reflujo por 24 horas bajo agitación constante y se sigue por *TLC*, empleando una mezcla *n*-hexano/acetato de etilo (1:1). Durante el transcurso de la reacción se aprecia la formación de un sólido. Al culminar, se deja a temperatura ambiente y el sólido resultante se filtra al vacío obteniendo el clorhidrato del producto de sustitución para los compuestos **11a-c**. Para los compuestos **11d-f**, la solución etanólica se evapora y sobre la mezcla resultante se adiciona una solución de NaOH 20%, precipitando un sólido que se filtra al vacío y se purifica por cromatografía en columna empleando un gradiente de polaridad, iniciando con una mezcla *n*-hexano/acetato de etilo de polaridad ascendente para ir aislando la 4,7-dicloroquinolina. Los productos finales **11a-f** fueron obtenidos como sólido de color blanco o amarillo. Estos compuestos finales controles fueron debidamente caracterizados por ¹H-RMN y ¹³C-RMN para comprobar su efectiva obtención (ver datos espectroscópicos abajo).

Datos espectroscópicos:

7-Cloro-*N*-(*p*-tolil)quinolin-4-amina 11a: sólido amarillo, 54 mg (rendimiento 68%). ¹H-RMN (400 MHz, metanol-*d*₄): δ 8.36 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.8 Hz, 4H), 6.83 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H). ¹³C-RMN (101 MHz, metanol-*d*₄): δ 150.99, 150.33, 148.79, 136.95, 135.31, 134.95, 129.78, 126.33, 125.17, 123.84, 123.27, 118.00, 100.82, 19.62.

7-Cloro-*N*-(*p*-clorofenil)quinolin-4-amina 11b: sólido amarillo, 65 mg (rendimiento 73%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.77 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H). ¹³C-RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.23, 144.35, 139.64, 138.99, 136.46, 132.20, 130.48, 128.04, 127.67, 126.38, 119.98, 116.53, 101.04.

7-Cloro-*N*-(*m*-hidroxifenil)quinolin-4-amina 11c: sólido amarillo, 61 mg (rendimiento 69%).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.94 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.75 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.89 (dd, J = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 7.37 (m, 1H), 6.89 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 6.80 (m, 3H). ^{13}C -RMN (101 MHz, DMSO- d_6): δ 159.21, 155.33, 144.07, 139.57, 138.93, 138.29, 131.27, 127.88, 126.36, 119.85, 116.35, 116.08, 115.31, 112.61, 100.96.

7-Cloroquinolin-4-morpholina 11d: sólido amarillo, 54 mg (rendimiento 48%).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.67 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.36 (dd, J = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.11-3.83 (m, 4H), 3.27-3.02 (m, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 156.79, 152.01, 150.20, 135.04, 129.02, 126.36, 124.99, 121.81, 108.95, 66.83, 52.63.

7-Cloroquinolin-4-pirrolidina 11e: sólido amarillo, 54 mg (rendimiento 48%).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.39 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.68 (t, 4H), 2.00 (t, 4H). ^{13}C -RMN (101 MHz, DMSO- d_6): δ 152.29, 150.73, 150.58, 133.62, 128.17, 127.46, 123.60, 119.41, 103.48, 52.39, 25.94.

7-Cloroquinolin-4-etoxi 11f: sólido amarillo, 65 mg (rendimiento 49%).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.72 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.27 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.61 (t, 3H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 161.63, 152.57, 149.77, 135.68, 127.87, 126.42, 123.55, 119.92, 100.90, 64.34, 14.45.

4.2. Biología

4.2.1 Cribado de compuestos en macrófagos humanos infectados con una línea bioluminiscente de *Leishmania infantum*

4.2.1.1 Cultivo de parásitos, línea bioluminiscente de *Leishmania infantum*

Se utiliza una línea bioluminiscente de *Leishmania infantum* que expresa de forma constitutiva una luciferasa de *Photinus pyralis* (PpyRE9H o RE9HLUC) ^[30] y que se mantiene en estado infectivo por ciclos de infección de ratones Balb/cJ [protocolo del Comité y Uso de Animales (CEUA), Institut Pasteur de Montevideo número 013-2023] y aislamiento de parásitos de bazo de animales infectados ^[31].

La forma promastigote de *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP263) se cultivó en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) con GlutaMAX™ (Invitrogen), complementado con 25 mM de sal sódica de HEPES (MERCK®) a pH 7,4, 10% v/v de suero fetal bovino inactivado (SFBi, Gibco®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) y 15 µg/mL higromicina B de *Streptomyces hygroscopicus* (Gibco®), en botella de cultivo con tapa de cierre hermético de 25 cm² (Corning®), en incubador a 28 °C.

Los parásitos se mantienen en cultivo por un mes, más allá de eso, pierden infectividad y deben ser descartados.

4.2.1.2 Cultivo de la línea celular monocítica humana

Las células de la línea monocítica humana THP-1 (ATCC® TIB-202™) se cultivaron en una botella de cultivo de 175 cm² con tapa ventilada (Corning®) en una atmósfera humidificada de 5% CO₂/ 95% aire a 37 °C, en medio RPMI complementado con 10% v/v de SFBi, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (medio completo RPMI para THP-1).

4.2.1.3 Conteo de células

La concentración de macrófagos viables se cuenta luego de teñir la muestra con azul de tripán (MERCK®) 0.2% p/v.

La concentración de parásitos viables fue determinada luego de realizar una dilución en PBS – glucosa 1% p/v, contando parásitos móviles.

Se utiliza un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) y una cámara de Neubauer (Precicolor HBG).

4.2.1.4 Preparación de fármacos y compuestos

Se prepara una solución madre en DMSO (MERCK®), que se diluye a una solución intermedia en DMSO, para después preparar una solución de trabajo en medio de cultivo completo RPMI para THP-1, que se coloca en la placa de 96 pocillos (Corning®), para crear la *placa de compuestos*.

Anfotericina B: a partir de una solución madre 0.27 mM (versión genérica de la Fungizona®, en la forma de deoxicolato de sodio, Gibco®), se prepara una solución intermedia 20 µM en DMSO y de esta una solución de trabajo 0.1 µM (CE₅₀) agregando 6 µL en 1194 µL de medio completo RPMI para THP-1, en un tubo cónicos de 1.5 mL (Corning®).

Miltefosina (MERCK®): en cabina de flujo laminar, se prepara una solución madre 20 mM en agua destilada y se esteriliza con filtro de 0.22 micras (MERCK®). Luego se realiza una dilución en agua destilada estéril para obtener una solución 1 mM y de esta una solución de trabajo 5 µM (CE₅₀) agregando 6 µL en 1194 µL de medio completo RPMI para THP-1, en un tubo cónico de 1.5 mL.

Cloroquina: en cabina de flujo laminar, se prepara una solución madre 20 mM en agua destilada y se esteriliza con filtro de 0.22 micras (MERCK®). Luego se realiza una dilución en agua destilada estéril para obtener una solución 4 mM y de esta una solución de trabajo 20 µM (CE₅₀) agregando 6 µL en 1194 µL de medio completo RPMI para THP-1, en un tubo cónico de 1.5 mL.

Compuestos: dependiendo de la solubilidad del compuesto se preparan soluciones madre a 25, 12.5 o 6.25 mM in DMSO que se disuelven por vortexeo. Para un cribado primario, desde la solución madre se preparan soluciones intermedias 4 y 1 mM en DMSO. Preparar las soluciones de trabajo agregando 6 µL de las soluciones intermedias en un tubo cónico de 1.5 mL, conteniendo 1194 µL de medio completo RPMI para THP-1, se mezcla por pipeteo y se chequea visualmente solubilidad (concentraciones finales de los compuestos evaluados en el cribado primario son 20 y 5 µM). Se agregan 270 µL por pocillo (cuadruplicado) en la *placa de compuestos* acorde al esquema que se muestra en la **Figura 11**.

Para estudios de concentración-respuesta, dependiendo de la actividad del compuesto en el cribado primario, realizar diluciones seriadas 1:2 o 1:3 en DMSO ya sea de la solución intermedia 4- o 1-mM. El rango de concentraciones evaluadas debe cubrir valores de viabilidad parasitaria de 100 a

0%, de forma de ser capaz de dar una aproximación a la CE_{50} , definida como la concentración de compuesto que baja la viabilidad parasitaria $50 \pm 10\%$.

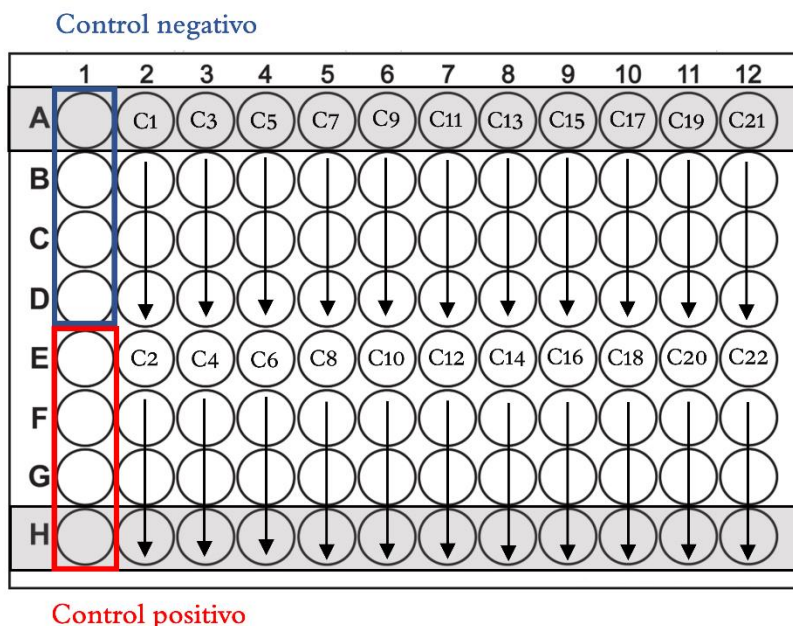


Figura 11. Esquema de plaqueo para cribado de compuestos y lectura del ensayo. Cada condición de compuesto (Cn, compuestos a determinada concentración) es evaluado por cuadruplicado, por triplicado para bioluminiscencia y monoplicado para microscopía (pocillos marcados en gris). El control negativo (rectángulo en azul) corresponden a las células tratadas con DMSO 0.5% (v/v) y el control positivo (rectángulo en rojo) a las células tratadas con anfotericina B 0.1 μM (CE_{50}) o miltefosina 5 μM (CE_{50}). Este esquema fue tomado de la referencia número 32 y traducido al español.

4.2.1.5 Ensayo de cribado

El protocolo descrito por Benítez,^[32] fue adaptado sustituyendo la célula hospedera, el macrófago de la línea J774.A1 (ATCC® TIB67™), por macrófagos derivados de la línea monocítica humana THP-1. Esta línea celular se cultivó en una botella de cultivo de 175 cm² con tapa de ventilación (Corning®), se transfirió a un tubo cónico de 50 mL y se incubó con 100 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato. Posteriormente, se transfieren con pipeta de 8 canales a una placa de cultivo de 96 pocillos (que le llamaremos, **placa de cribado**), 200 μL /150,000 monocitos por pocillo. Después de 2 días, se lavan los macrófagos con PBS y se infectan con promastigotes en fase estacionaria en una relación 1:4, durante 24 h. Previo a la infección hay que asegurarse que no

queden restos del antibiótico de selección (higromicina) en el cultivo de parásitos, por lo que se hacen 2 lavados en *PBS* – glucosa 1% p/v y se resuspenden en medio completo de RPMI para THP-1.

Luego de realizar la infección, la placa se lava tres veces con 200 μ L de *PBS* preincubado a 37 °C, asegurando que se eliminan los parásitos no internalizados por la célula hospedera y se transfieren 200 μ L desde la **placa de compuestos** a la **placa de cribado**. Se incuba durante 4 días.

El procedimiento de lectura es el mismo descrito por Benítez, ^[32] empleando el *kit* de PROMEGA E4530, que incorpora dos componentes, uno que permite la lisis celular (buffer de lisis $\times$ 5, PROMEGA E397A) y otro la posterior determinación bioluminiscencia (BL) con el reactivo, *LAR* (*Luciferase Activity Reagent*, PROMEGA E151A). Tres pocillos se lisan y se utilizan para medir carga parasitaria por BL. Uno de los pocillos se fija con etanol absoluto (CARLO ERBA) y se analiza por microscopía de fluorescencia.

Una representación esquemática del ensayo se muestra en la **Figura 12**.

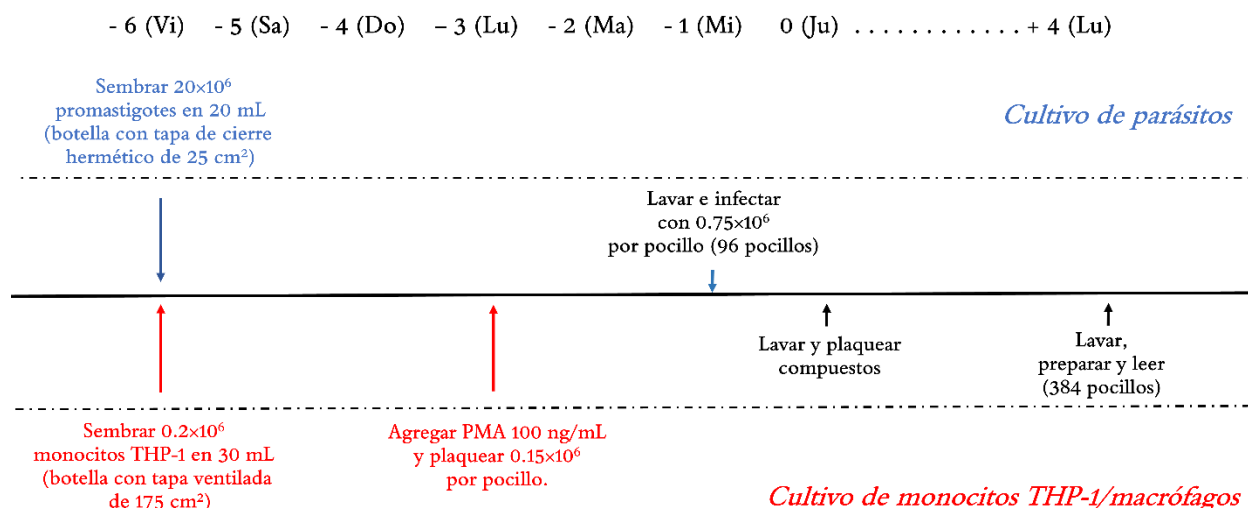


Figura 12. Cronograma para el ensayo de cribado de compuestos *versus* macrófagos humanos derivados de monocitos THP-1 con una línea bioluminiscente de *Leishmania infantum*. Arriba se indican los días, jueves (día 0), es el momento cuando se transfieren los compuestos (desde la **placa de compuestos**) hacia los macrófagos infectados (**placa de cribado**). En azul y en rojo se indican los procedimientos que involucran la manipulación de parásitos y macrófagos, respectivamente, mientras que en negro los procedimientos de infección o con células infectadas. PMA, forbol 12-miristato 13-acetato.

4.2.1.6 Lectura de viabilidad parasitaria por bioluminiscencia

En las filas B a G (ver **Figura 11**), agregar 30 μ L del buffer de lisis $\times 1$ por pocillo y homogenizar exhaustivamente para asegurar el lisado celular pipeteando de forma circular contra el borde del pocillo, de arriba hacia abajo, diez veces. Ajustar el volumen de forma de obtener una señal para el control negativo (DMSO) en el orden de 0.5 a 1 millón de unidades relativas de luminiscencia y transferir dicho volumen desde la **placa de cribado** a una placa de lectura opaca de 384 pocillos (NUNC[®]) (placa de lectura). Incubar dicha placa a 30 °C por 5 min en el luminómetro [LUMIstar OPTIMA Microplate (BMG LABTECH)]. Descongelar el *LAR* a temperatura ambiente. Agregar 30 μ L por pocillo. Medir intensidad de BL configurando los siguientes parámetros: 30 °C de temperatura, 10 segundos de agitación, 5 segundos de adquisición por pocillo, 0.2 segundos de espera en la medida, máxima ganancia.

4.2.1.7 Lectura por microscopía para evaluar densidad celular y confirmación de compuestos activos

En las filas A y H (ver **Figura 11**), remover el etanol de las filas fijadas y agregar 100 μ L de verde de metilo 0.0004% w/v en PBS para teñir *ADN* ^[33]. Inspeccionar por microscopía de fluorescencia (microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX-81 equipado con una cámara ORCA, Hamamatsu y el programa libre μ Manager, ^[34] longitud de onda de excitación 633 nm y longitud de onda de emisión 677 nm). Capturar cinco imágenes con aumento 100 $\times$ (visión panorámica del pocillo control cualitativo de toxicidad sobre la célula hospedera) y al menos 10 imágenes con aumento 400 $\times$ cubriendo los 4 cuadrantes y el centro del pocillo. Se realiza una evaluación cualitativa de densidad de células hospederas en el pocillo y de carga parasitaria.

Se define una condición como **no tóxica** si se mantienen adheridas más de un 80% de las células hospederas y **tóxica** si se despegan más de un 80%.

Se define **cleareance**, como una disminución de carga de amastigotas mayor al 90% relativo al control negativo, ver **Figura 13**).

Las imágenes son procesadas con el programa FIJI ^[35].

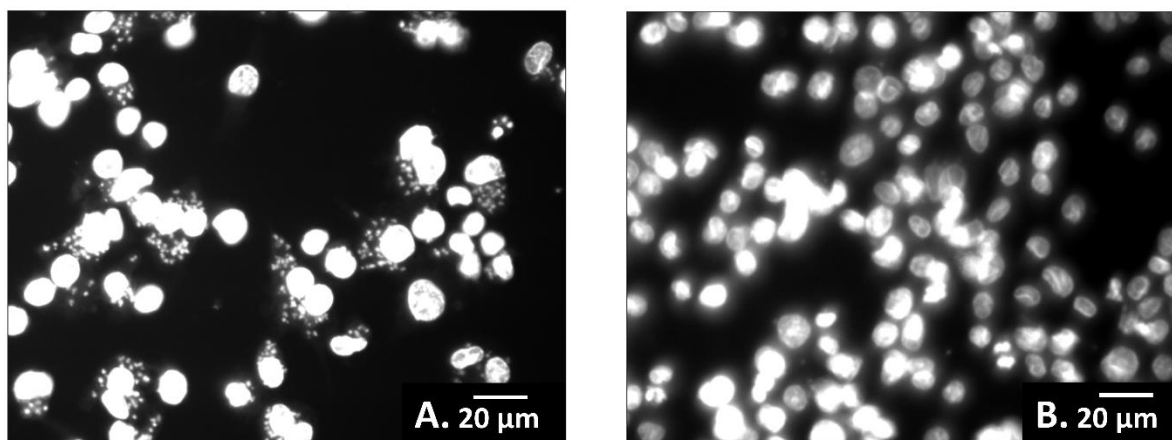


Figure 13. Imágenes de cultivos de macrófagos humanos infectados teñidos con verde de metilo (ADN), tomadas con microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX-81. **(A)** Control negativo, muestra tratada con el vehículo en que se disuelven los compuestos (DMSO 0.5% v/v). Se observan macrófagos infectados. **(B)** Muestra tratada con compuesto o fármaco a una concentración parasiticida. Se observa que actúa de forma selectiva, es decir, no afecta las células hospederas, causando una disminución de carga de parásitos mayor al 90%, lo que denominamos como *clearence*.

4.2.1.8 Parámetros de calidad y validación del ensayo

Calcular el coeficiente de variación (CV) ^[36] para la lectura por BL aplicando la siguiente ecuación:

$CV = (DE_{neg \text{ for } BL}) / BL_{neg} \times 100$, donde *DE* se refiere a la desviación estándar.

Calcular el factor Z' ^[37] para la lectura por BL aplicando la ecuación:

$$\text{Factor } Z' = [1 - (3 \times DE_{\text{blanco } BL} + 3 \times DE_{\text{neg } BL}) / (BL_{\text{neg}} - BL_{\text{blanco}})].$$

Calcular la viabilidad parasitaria para los fármacos y compuestos evaluados aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = [(BL_{\text{com}} - BL_{\text{blanco}}) / (BL_{\text{neg}} - BL_{\text{blanco}}) \times 100]$$

El ensayo es validado cuando el factor $Z' > 0.5$ y el CV $< 17\%$ para el control negativo, y la viabilidad para el control positivo es $\sim 50\%$.

Los sufijos empleados en las ecuaciones refieren a: com = compuestos o fármacos; blanco = control de BL nula (pocillo vacío en placa de 384 pocillo).

neg = control negativo correspondiente a los macrófagos infectados y tratados con 0.5% v/v DMSO. Para los datos obtenidos por BL por triplicado, de ser necesario remover un *outlier* para cumplir con los parámetros de calidad del ensayo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Química

5.1.1. Síntesis de los derivados deshidroxilados de isoquina

Los derivados deshidroxilados de isoquina son caracterizados por variaciones funcionales de los sustituyentes Y por diferentes halógenos (F, Cl, Br y I) o hidrógeno, así como variaciones del sustituyente X por diferentes grupos dialquilaminos (morfolino, pirrolidina y piperidina) (ver estructuras en **Esquema 1**, pág. 32). La funcionalidad X consta de las mencionadas dialquilaminas, debido a que estas funcionalidades generaron compuestos activos en nuestros antecedentes de derivados de isoquina e isotebuquina. La funcionalidad Y busca verificar si es posible mejorar la actividad de derivados sustituidos con pirrolidino y piperidino, los cuales no fueron activos contra modelos *in vitro* de promastigote de *L. infantum*. También se busca verificar si es posible incrementar la selectividad del derivado activo de morfolino.

Para la síntesis de los derivados de isoquina, se planteó la ruta mostrada en el **Esquema 1**. El punto clave es obtener los 15 intermedios de 4-nitrobencilaminos **2a-o**, los cuales están basados en cinco grupos definidos por el sustituyente X y constituido cada uno por tres compuestos definidos con el sustituyente X de dialquilamina. Los derivados **2a-c**, que están revestidos por sustituyente X de hidrógeno, fueron preparados fácilmente mediante una reacción de S_N2 entre el bromuro de 4-nitrobencilo y la dialquilamina correspondiente en presencia de trietilamina, dando los productos deseados con rendimientos de reacción superior al 60%. Espectroscópicamente, la obtención de los intermedios **2a-c** fue verificada por aparición de nuevas señales en la región de hidrógenos o carbonos alifáticas tanto en los espectros de ¹H-RMN como ¹³C-RMN, con la integración esperada respecto a los protones aromáticos del sistema espectroscópico AB típico de la 4-nitrobencilamina tal como se muestra en la data mostrada en la sección 4.1.2.1.1.1.

Por su parte, los derivados bromados **2d-f** fueron obtenidos mediante una bromación aromática vía S_EAr de los compuestos p-nitrobencilaminas **2a-c** utilizando NBS como agente bromante en presencia de ácido sulfúrico concentrado. Esta reacción permitía no solo monobromar, sino que polibromar el anillo, por lo que la correcta equivalencia permitió tener como producto mayoritario el compuesto monobromado, fácilmente purificable después de neutralizada la mezcla y extraída, por cromatografía en columna en gradiente de polaridad. En este caso, no hubo grandes diferencias

en la reactividad, y los rendimientos de reacción son bajos, siendo de 19% a 30%, pero aceptables para la obtención de los respectivos derivados y la continuación de la ruta. Espectroscópicamente, la obtención de los intermedios **2d-f** fue verificada por aparición de tres señales de protones aromáticos caracterizados en el ^1H -RMN por un doblete de $J = 8$ Hz, un doble-doblete de $J = 8$ y 3 y, otro doblete de J pequeña de 3 Hz, que son típicas de un sistema aromático 1,2,4-sustituido que prueba la bromación aromática de los precursores **2a-c** a los derivados **2d-f**. En los espectros de ^{13}C -RMN, se aprecian seis carbonos aromáticos con desplazamientos químicos diferentes entre ellos, así como los carbonos correspondientes al grupo dialquilamino.

Para obtener los intermedios iodados **2g-i** se planteó una reacción de intercambio de halógeno de Filkenstein utilizando los intermedios bromados **2d-f** utilizando una agente yodante de KI en presencia de yoduro de cobre (I) como promotor. La reacción evoluciona en presencia de una mezcla de acetona-etanol bajo calentamiento por 24 h. El intercambio se favorece por la activación inicial del enlace C-Br en los intermedios **2d-f** vía una adición oxidativa del cobre(I) generando un intermediario organometálico tentativo de yoduro de arilcobre (III) (**Figura 14**). A partir de estos derivados 4-(2-bromo-4-nitroencil)dialquilamina, se obtuvieron los derivados iodados por reacción de intercambio de halógeno tipo Filkenstein, utilizando una mezcla 1:1 (H_2O :Acetona) como solvente, sal de KI como fuente de ioduros y CuI 10% y ascorbato de sodio 20% como catalizadores bajo atmosfera inerte. Esta reacción permite el intercambio del halógeno del anillo aromático para el que esté en mayor proporción en el medio de reacción. Para la yodación, el exceso de KI permite tener 10 veces más yoduro en el medio que bromuros después del intercambio, favoreciendo el producto de yodación. Existe el compromiso entre la reactividad intrínseca del halógeno como sustituyente en el anillo frente a una transmetalación (el yodo es más reactivo) y la posibilidad de reversibilidad del intercambio, por ello, es importante la elección de una condición donde el halógeno a cambiar sea el más susceptible a mantenerse como sustituyente del areno dentro del equilibrio. Eso se logra por ejemplo con la elección de un solvente que ayude a precipitar la sal del halógeno a intercambiar. En nuestro caso, la sal de KBr es más insoluble en el medio de reacción que la sal de KI, permitiendo en conjunto con la adición en exceso de KI un intercambio eficaz del bromo por yodo. La reacción de intercambio de halógeno tipo Filkenstein para obtener los derivados 4-(2-yodo-4-nitroencil)dialquilamina tuvo excelentes rendimientos para todos los materiales de partida, superiores al 90% sin existir cambios importantes en la

reactividad entre los materiales de partida utilizados. Espectroscópicamente, el intercambio fue verificable por los desplazamientos químicos de los protones aromáticos.

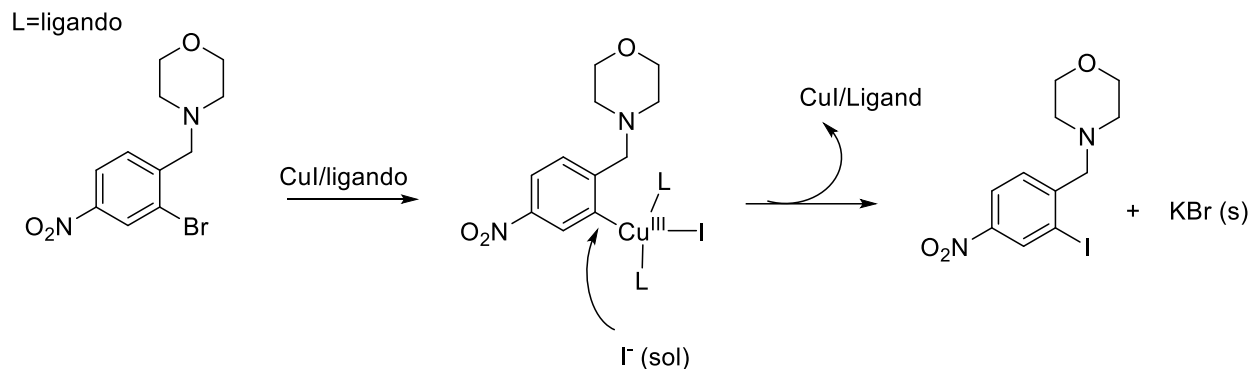


Figura 14. Mecanismo de activación de enlace C-Br para la yodación aromática vía adición oxidativa de Cu(I) a Cu(III) bajo atmósfera inerte. El ligando en la reacción ejecutada es ascorbato.

Para la obtención de los intermedios fluorados **2j-I** y los clorados **2m-o** se partió de reactivos comerciales de 2-flúor-4-nitrotolueno y 2-cloro-4-aminotolueno, respectivamente. La síntesis de los intermedios fluorados **2j-I** envolvió una ruta de dos pasos partiendo de 2-flúor-4-nitrotolueno **1b**. El primer paso consistió en una reacción de bromación bencílica utilizando NBS como agente halogenante, en CH₃CN como solvente y bajo irradiación de luz LED a 60 °C por 6 horas, lo cual permitió la conversión alrededor del 50%, determinado por espectroscopia de ¹H-RMN, del producto de monobromación bencílica **1c**, quedando la otra parte sin reaccionar. La mezcla resultante posteriormente se trata con la dialquilamina correspondiente en presencia de trietilamina y tolueno para dar los intermedios **2j-I**, los cuales fácilmente purificados mediante una extracción ácido-base sobre la mezcla de tolueno utilizando una solución de HCl 2M con el objeto de extraer el producto **2j-I** a la fase acuosa y dejar en la fase orgánica la contaminación resultante de **1b** no reaccionante del paso de bromación bencílica y alguna otra contaminación orgánica neutra. La fase acuosa se neutraliza a un *pH* ligeramente básico y se extrae con disolvente orgánico para obtener con una alta pureza los intermedios **2j-I**. Espectroscópicamente, la obtención de los intermedios **2j-I** fue verificada por aparición de nuevas señales en la zona alifática tanto en los espectros de ¹H-RMN como ¹³C-RMN correspondiente al grupo dialquilamino, con la integración esperada respecto a los protones aromáticos del sistema químico tal como se evidencia en la data mostrada en la sección 4.1.2.1.1.4.2.

Respecto a la preparación de los intermedios clorados **2m-o**, se empleó una estrategia poco habitual partiendo de la 2-cloro-4-aminotolueno debido a la no disposición de la conveniente 2-cloro-4-nitrotolueno. La reacción envolvió una ruta de tres pasos, iniciando con una reacción de oxidación para la conversión del grupo amino en el reactivo de 2-cloro-4-aminotolueno **1d** al grupo nitro. De la reacción se obtuvo una mezcla de productos de oxidación de nitro (**1e**) y el derivado nitroso (**1e'**) con propiedades de solubilidad y valores de Rfs similares entre sí, siendo difícil de separar. Sin embargo, la presencia de esta mezcla con potencial de reducirse en presencia de estaño al mismo producto en uno de los últimos pasos permitió seguir avanzando con la mezcla. La reacción de oxidación procedió en presencia de sulfato de manganeso y oxono como promotor de la oxidación y esta ocurrió muy rápidamente a temperatura ambiente en un corto tiempo (10-20 minutos). Posteriormente, esta mezcla fue tratada bajo condiciones de bromación bencílica en presencia de luz *LED* (13 W) para dar los intermedios **1f** y **1f'**. La reacción procedió bajo una baja conversión (menor 15%) a pesar del exceso de NBS y tiempo. Sin embargo, igualmente como se procedió con el intermedio fluorado **1d**, la mezcla fue directamente tratada con las dialquilaminas en tolueno y en presencia de trietilamina, siendo posible aislar los productos de sustitución **2m-o** después de aplicar la extracción ácido-base sobre tolueno con subsecuente neutralización y extracción con disolvente orgánico. Los compuestos fueron aislados con una pureza aceptable de espectroscopia de RMN, donde fue posible verificar los productos esperados por la aparición de nuevas señales en la región alifática en los espectros de ¹H-RMN correspondiente al grupo dialquilamino, con la integración esperada respecto a los protones aromáticos del sistema químico tal como se evidencia en la data mostrada en la sección 4.1.2.1.1.5. Es importante mencionar que estos intermedios fueron encontrados como una mezcla entre la forma nitro **2m-o** y la forma nitroso **2m'-o'**, con desplazamientos químicos muy similares para sus protones en el ¹H-RMN.

Con los intermedios de 4-nitrobencilaminas **2a-o** en mano, se procedió a la obtención de las anilinas correspondientes **3a-o** mediante una reacción de reducción utilizando estaño en medio ácido a 60 °C en HCl (concentrado) por tres horas, consiguiendo la reducción a anilina con excelentes rendimientos entre 84% y 88%. Para esta reacción, no se apreciaron variaciones importantes en la reactividad de los materiales de partida. Es importante mencionar que el aislamiento es un paso crítico y este debe ser realizado con cuidado para que la precipitación del hidróxido de estaño sea manejable y no contamine el producto final (extracciones a *pH* cercano 7, *pH* mayores generan precipitado de hidróxido de estaño). Los compuestos fueron aislados con una

pureza aceptable de espectroscopia de RMN, donde fue posible verificar los productos esperados por el corrimiento de las señales aromática a campo más alto en el espectro de ^1H -RMN, lo que demuestra que la reducción del grupo nitro al amino se dio efectivamente, ya que el grupo amino en anillo aromáticos disminuyen los valores en ppm del desplazamiento químicos de protones aromáticos comparado a anillos funcionalizados con el grupo nitro. La integración y desplazamiento químico en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN corresponde a los esperados para los intermedios **3a-o** tal como se evidencia en la data mostrada en la sección 4.1.2.1.1.6.

Finalmente, el último paso de reacción consistió en una reacción entre la anilina correspondiente **3a-o** y la 4,7-dicloroquinolina en etanol y catalizada con HCl. Esta reacción procedió bajo un mecanismo de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, donde la adición del HCl es clave para la protonación del nitrógeno quinolínico, lo cual aumenta la susceptibilidad del carbono 4 hacia la $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ por parte de la anilina correspondiente. En general, la reacción mostro una buena eficiencia para obtener los derivados hidrogenados (**4a-c**) y bromados **4d-f** dando los productos esperados con rendimientos entre 50 y 70%. Por su parte, solo los derivados de morfolino de las anilinas flúorada **3k** y clorada **3n** reaccionaron con la 4,7-dicloroquinolina para dar los productos **4k** y **4n**. Los otros derivados de pirrolidino y piperidino no reaccionaron. Finalmente, los intermedios de anilinas yodadas no reaccionaron con 4,7-dicloroquinolina, aislándose netamente 4-etoxi-7-cloroquinolinas para todos estos últimos casos, prefiriendo reaccionar esta quinolina con el etanol que con estas anilinas. Esto sugiere que la presencia de heteroátomos tales como flúor, cloro y especialmente iodo reduce la reactividad de la anilina para las $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ con la 4,7-dicloroquinolina. Este cambio en la reactividad nucleofílica de las anilinas halogenadas podría deberse a la prevalencia de un efecto inductivo atractor de electrones importante sobre el sistema aromático, haciéndolos menos reactivos que los sistemas no halogenados, existiendo sistemas como los iodados en los que no se vio avance en la reacción.

El aislamiento y purificación de los productos de isoquina envuelve la obtención en algunos casos en sus formas clorhidrato y/o neutras. El aislamiento de estos productos finales representa un mayor desafío cuando la solubilidad en etanol del producto de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ aumenta. En ese caso mucha proporción del producto no precipita en su forma clorhidrato, lo que no deja otra opción que trabajar una mezcla compleja de reactivos no reaccionantes, productos secundarios y el producto a purificar, en este caso la purificación estándar es por cromatografía en columna en

gradiente de polaridad con fases móviles polares, empezando con una mezcla de 8:2 (AcOEt:*n*-hexano).

5.1.2 Síntesis de los derivados deshidroxilados de isotebuquina

Para la síntesis de los derivados de la serie isotebuquina, se realizó una ruta de síntesis que consta de 5 pasos de reacción partiendo de 2-bromo-4-nitrotolueno, siguiendo estrategia reportada previamente por Romero ^[10b]. El primer paso de reacción fue el acoplamiento cruzado tipo Suzuki-Miyaura catalizado por paladio utilizando los respectivos ácidos fenil borónicos y 2-bromo-4-nitrotolueno. Esta reacción es en dos fases, donde se utiliza una mezcla de solventes (etanol, H₂O y Tolueno) que permite la solubilización de los ácidos fenil borónicos en la fase acuosa, y del material de partida y el producto en la fase orgánica, reaccionando en la interfase bajo calentamiento por 24 horas. Es muy importante el agregado de base, lo que permite la desprotonación y activación de los ácidos fenil borónicos para que ocurra la transmetalación y posterior eliminación reductiva del catalizador de paladio. En esta reacción, se vio una baja importante en la reactividad cuando el sustituyente del ácido fenil borónico fue el trifluorometilo en posición para, donde el rendimiento de reacción bajo de mayor a 70% como en el resto de ácidos fenil borónicos, a 41%. Esto podría deberse a un efecto inductivo importante de este grupo, que baje la densidad electrónica sobre el anillo, generando que sea menos susceptible a la transmetalación en el complejo frente al intercambio con el halógeno aromático. Con otros sustituyentes como el trifluorometilo pero en posición meta, el efecto inductivo no parece generar un cambio tan apreciable en la reactividad, y en el caso de tener como sustituyente flúor, la reactividad parece mantenerse, aunque disminuyendo sensiblemente en el caso de la posición meta respecto a la posición para. Los compuestos fueron aislados con una pureza aceptable de espectroscopia de RMN, donde fue posible verificar los productos esperados por la aparición de nuevas señales en la región aromática en los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN correspondiente al grupo fenilo extra. La integración y desplazamiento químico en los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y ¹⁹F-RMN corresponde a los esperados para los intermedios **6a-d** tal como se evidencia en la data mostrada en la sección 4.1.2.2.1.

El siguiente paso es la bromación bencílica sobre los sistemas bifenilo nitrotoluenos, utilizando NBS como agente halogenante en acetonitrilo bajo irradiación de luz *LED* por 6 horas a 80 °C. En este caso siempre se obtuvieron mezclas con las que se siguió la ruta, pero donde el compuesto de

monobromación bencílica es el producto mayoritario, siendo los contaminantes el producto de dibromación bencílica y el material de partida. Ambos contaminantes no interfieren con la ruta de reacción, debido a que el siguiente paso envuelve una aminación vía S_N2 utilizando dialquilaminas como nucleófilo en las condiciones antes descritas para la serie uno y el método de purificación del producto, estos contaminantes dejan de ser un problema. El compuesto bifenilo nitrotolueno sin reaccionar, en la primera extracción ácido base queda en la fase orgánica, y así también el producto de dibromación bencílica, el cual puede reaccionar con el exceso de dialquilamina para formar un imino que en contacto con agua y en medio básico puede hidrolizarse, también separándose en las extracciones ácido base. En esta reacción, para los sistemas bifenilos con flúor como sustituyente, la dialquilamina más reactiva fue la pirrolidina, siendo la que dió los mejores rendimientos de reacción, sin embargo, para los sistemas bifenilos con trifluorometilo como sustituyente la dialquilamina más reactiva fue la piperidina. Los compuestos fueron aislados con una pureza aceptable de espectroscopia de RMN, donde fue posible verificar los intermedios **7a-d** esperados por el corrimiento a campo bajo de 3.5 ppm a 4.4 ppm de los protones bencílicos en los espectros de ^1H -RMN, con la integración esperada respecto a los protones aromáticos del sistema químico tal como se evidencia en la data mostrada en la sección 4.1.2.2.2.

El siguiente paso es la reducción del grupo nitro de los sistemas bifenil nitro bencilaminas en las condiciones antes descritas. En este caso no se ven tendencias claras en las reactividades, si bien los rendimientos van desde 52% a 95%, no parece ser atribuible a alguna restricción química, sino a cuestiones experimentales, las cuales podrían no mostrar en este paso reproducibilidad sobre todo en los rendimientos bajos, teniendo en cuenta lo robusto de la reacción de reducción de grupo nitro con estaño, y la verificación por *TLC* de la finalización de la conversión del grupo nitro a anilino. Respecto a la caracterización química, tal como se evidenció para los intermedios **3a-o**, la efectiva reducción del grupo nitro en los intermedios **8a-k** fue posible verificar los productos esperados por el corrimiento de las señales aromática del fragmento anilínico a campo más alto en el espectro de ^1H -RMN, lo que demuestra que la reducción del grupo nitro al amino se dio efectivamente. La integración y desplazamiento químico en los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{19}F -RMN corresponde a los esperados para los intermedios **9a-k** tal como se evidencia en la data mostrada en la sección 4.1.2.1.1.6.

En el último paso de reacción, la S_NAr sobre la 4,7-dicloroquinolina se realizó en iguales condiciones que en los derivados de la serie de isoquina. Aquí los resultados de rendimientos

fueron bastante heterogéneos, siendo la purificación algo más desafiante por las solubilidades de los productos finales en el etanol, aun en su forma de clorhidrato. Para todas las que no se obtuvo un producto filtrable en el primer paso de filtración, se requirió neutralizar con NaOH 10% y extraer para realizar una cromatografía, donde en muchos casos los contaminantes de la mezcla final son 4,7-dicloroquinolina, producto secundario de sustitución por etanol, o la misma anilina no reaccionante. Sin embargo, casi todas las reacciones superan el 40% de rendimiento, existiendo dos únicos casos donde se obtienen rendimientos menores (**10a** y **10e**), pero que en su conjunto y después de 5 pasos de síntesis permiten obtener los derivados deseados. Los compuestos fueron aislados con una pureza aceptable de espectroscopia de RMN, donde fue posible verificar la efectiva obtención los productos **10a-k**, corroborando la integración y desplazamiento químico esperados en los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{19}F -RMN tal como se evidencia en la data mostrada en la sección 4.1.2.1.1.7.

5.2. Actividad biológica

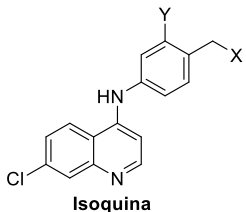
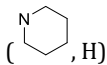
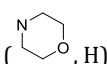
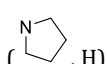
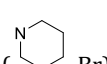
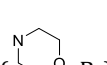
La actividad leishmanicida de los compuestos deshidroxilados de isoquina **4a-f**, **4k** y **4n** e isotebuquina **10a-k** así como controles quinolónicos **11a-f** fue probada directamente sobre un modelo de macrófagos humanos infectados, derivados de células monocíticas THP-1. Miltefosina y anfotericina B fueron usadas como controles positivos a sus respectivas CE_{50} . A partir del ensayo de actividad biológica contra la forma intracelular del parásito, se obtuvieron valores de actividad leishmanicida y toxicidad en macrófagos infectados (**Tabla 14**).

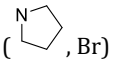
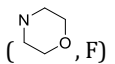
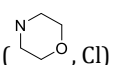
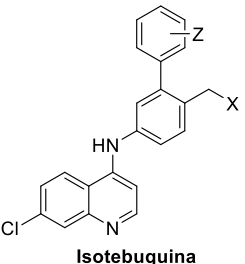
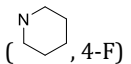
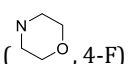
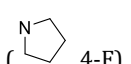
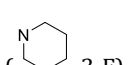
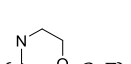
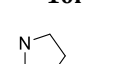
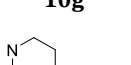
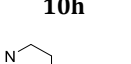
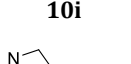
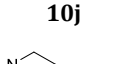
Si bien no existe estandarización para los ensayos de cribado de nuevas entidades químicas *versus* tripanosomátidos, las condiciones en que se ha definido este ensayo se aproximan a los ensayos empleados en las principales plataformas de referencia en el mundo que trabajan en macrófagos humanos infectados y se hace lectura con tecnología de microscopía automatizada [38,39,40,41]. Con el objetivo de superar estas dificultades, en el Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, se ha generado y caracterizado una línea reportera bioluminiscente de *L. infantum* [32, 42] que permite montar un ensayo infección de macrófagos humanos, que resulta ser sencillo, robusto y reproducible. Para ilustrarlo, los parámetros de calidad para los ensayos de cribados realizados en el marco de esta Tesina, para un total de 8 placas ensayadas, arrojan un factor Z' y CV promedios de 0,8 (máximo de 0,96, mínimo de 0,62) y 5% (máximo de 14%, mínimo de 2%), respectivamente.

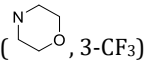
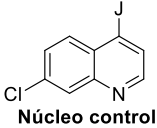
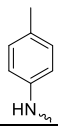
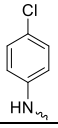
Importante a destacar es que esta línea expresa de forma constitutiva una luciferasa de *Photinus pyralis*, corrida al rojo, ^[30] lo que lo convierte en un gen reportero apropiado para aplicaciones no solo *in vitro*, sino que también *in vivo* ^[43,44,45].

Un ensayo de estas características no solo permite discriminar compuestos con actividad leishmanicida contra la forma clínicamente relevante del parásito, en las condiciones biológicas en que se lleva a cabo la infección, sino que también la evaluación simultánea de toxicidad *versus* la célula hospedera infectada. De esta manera se optimizan los recursos en los estudios preclínicos en la búsqueda de nuevas entidades químicas para tratar esta patología, permitiendo, por ejemplo, proyectarse para realizar los estudios de evaluación de eficacia terapéutica en modelos murinos empleando tecnología de imagenología *in vivo*.

Tabla 14. Resultados de evaluación leishmanicida en el modelo de infección de macrófagos humanos infectados con *L. infantum*.

Serie	Compuesto (sustituciones x,y/ x,z/j) o fármaco	Actividad leishmanicida a 20 μ M (o a la concentración indicada, μ M) ^a	Viabilidad parasitaria (%) a la concentración reportada (μ M) o $\sim$ CE₅₀ (μ M)	Toxicidad <i>versus</i> macrófago humano a 20 μ M (o a la concentración reportada, μ M) ^b	Índice de Selectividad	Solubilidad a 20 μ M ^c
 Isoquina	4a 	<i>Clearance</i> (2.5)	34 $\pm$ 6 a 1	No Tóxico (2.5)	I.S. > 2.5	Soluble
	4b 	<i>Clearance</i>	CE₅₀ $\sim$ 1.25	No Tóxico	I.S. > 16	Soluble
	4c 	<i>No Clearance</i>	No Activo (5)	Tóxico	N.D.	Soluble
	4d 	<i>Clearance</i>	38 $\pm$ 8 a 5	No Tóxico	I.S. > 4	Soluble
	4e 	<i>No Clearance</i> (5)	75 $\pm$ 7 a 5	Tóxico	N.D.	Soluble

	4f 	<i>Clearance</i>	CE₅₀ ~ 2.5	No Tóxico (10)	I.S. > 4	Soluble
	4k 	<i>No Clearance</i>	63 ± 7 a 20	No Tóxico	N.D.	Soluble
	4n 	<i>No Clearance</i>	CE₅₀ ~ 20	No Tóxico	I.S. > 1	Soluble
 Isotebuquina	10^a 	<i>Clearance (5)</i>	CE₅₀ ~ 1.25	No Tóxico (5)	I.S. > 4	No Soluble
	10b 	<i>Clearance</i>	29 ± 3 a 10	No Tóxico	I.S. > 2	Soluble
	10c 	<i>Clearance (5)</i>	CE₅₀ ~ 1.25	No Tóxico (5)	I.S. > 4	No Soluble
	10d 	<i>Clearance (5)</i>	CE₅₀ ~ 5	No Tóxico (5)	I.S. > 1	No Soluble
	10e 	<i>No Clearance</i>	CE₅₀ ~ 10	No Tóxico	I.S. ~ 2	Soluble
	10f 	<i>Clearance (5)</i>	CE₅₀ ~ 1.25	No Tóxico (5)	I.S. > 4	No Soluble
	10g 	<i>No Clearance</i>	No Activo	No Tóxico	N.D.	Soluble
	10h 	<i>No Clearance</i>	No Activo	No Tóxico	N.D.	Soluble
	10i 	<i>No Clearance</i>	No Activo	No Tóxico	N.D.	Soluble
	10j 	<i>Clearance</i>	20 ± 4 a 5	No Tóxico	I.S. > 4	Soluble

	10k 	No Clearance	No Activo	No Tóxico	N.D.	Soluble
 Núcleo control	11^a 	No Clearance (5)	No Activo	Tóxico	N.D.	Soluble
	11b 	No Clearance	No Activo (5)	No Tóxico	N.D.	No soluble
	11c 	No Clearance	No Activo	No Tóxico	N.D.	Soluble
	11d 	No Clearance	No Activo	No Tóxico	N.D.	Soluble
	11e 	No Clearance	No Activo	No Tóxico	N.D.	Soluble
	11f 	No Clearance	No Activo	No Tóxico	N.D.	Soluble
Fármacos de referencia	Cloroquina	No Clearance	CE ₅₀ ~ 20	No Tóxico	I.S. > 1	Soluble
	Miltefosina	Clearance	CE ₅₀ ~ 5	No Tóxico	I.S. > 4	Soluble
	Anfotericina B	Clearance (1.25)	CE ₅₀ ~ 0.11	No Tóxico (1.25)	I.S. > 11	Soluble

^a**Clearance**, significa una caída en la carga parasitaria confirmada por microscopía de fluorescencia > al 90% a la concentración evaluada.

No clearance, significa que no se modifica la carga parasitaria relativo al control negativo conteniendo DMSO 0.5% v/v.

^bToxicidad: se define un compuesto como **No Tóxico** si se mantienen adheridas más de un 80% de las células hospederas y **Tóxico** si se despegan más de un 80%, evaluada por microscopía de fluorescencia.

CE₅₀ ~ X μM, significa que la viabilidad parasitaria (evaluada por bioluminiscencia) es 50 ± 10% a la concentración X.

No Activo, significa que la viabilidad parasitaria es 100 ± 10% a 20 μM.

Índice de Selectividad (I.S.), concentración no tóxica/ aproximación a la CE₅₀.

Los compuestos sombreados en negrita son definidos como *hits*. Se define *hit* aquel compuesto que su CE₅₀ sea menor a 20 μM, no presente toxicidad y evidencie clearance a 20 μM, sin problemas de solubilidad en las condiciones del ensayo.

^cLa solubilidad del compuesto (**soluble** o **no soluble**) se evalúa por inspección de formación de cristales en el pocillo por microscopía óptica, antes de iniciar el procesamiento para la lectura de la placa.

CE₅₀ (Concentración Efectiva 50). **N.D.**: No determinado

De los resultados, primeramente, es posible notar que los compuestos controles **11a-f** que carecían del grupo amino terciario terminal presentaron, nula actividad leishmanicida frente la forma amastigote intracelular de *L. infantum* comparada con la actividad de los derivados de isoquina **4a-f**, **4k**, **4n** y los de isotebuquina **10a-k**. Estas observaciones permiten inferir que la presencia de un grupo amino, en este caso terciario, sobre la funcionalidad de 4-anilino es de relevancia para generar compuestos activos, siendo un grupo para tomar en consideración en combinación con grupos lipofílicos para el diseño de agentes leishmanicidas basados en 4-aminoquinolinas.

Analizando el sistema deshidroxilado de isoquina **4a-f**, **4k** y **4n**, el compuesto más activo fue el hidrogenado de piperidina **4a**, con un CE_{50} menor a 1 μM , causando *clearance* a 2.5 μM (I.S. > 2.5), pero apreciable toxicidad a concentraciones mayores a 2.5 μM . Le sigue el compuesto hidrogenado de morfolina (**4b**) con $CE_{50} \sim 1.25 \mu M$ e I.S. > 16. Los sistemas bromados de piperidina (**4d**) y pirrolidina (**4f**) mostraron buena actividad $CE_{50} < 5$ y $\sim 2.5 \mu M$, respectivamente, y valores estimados de I.S. > 4. El resto de derivados, hidrogenado de pirrolidina (**4c**), bromado de morfolina (**4e**) y el fluorado (**4k**) y clorado (**4n**) de morfolina, mostraron actividades discretas a casi nulas. Esta evaluación biológica en los derivados deshidroxilados de isoquina nos dejó como resultado dos *hits* (**4b** y **4d**) tomando como *hit* aquel compuesto que su CE_{50} sea menor a 20 μM , no presente toxicidad y evidencie *clearance* a 20 μM , sin problemas de solubilidad en las condiciones del ensayo (formación de cristales).

Un análisis cualitativo de relación estructura con actividad para la serie de isoquina (ver **Figura 15**), muestra que es posible modular la selectividad por la incorporación de un halógeno como el bromo en el fragmento anilínico. Por ejemplo, los derivados bromados, **4d** y **4f**, mostraron una actividad leishmanicida en un rango similar a sus correspondientes derivados hidrogenados, **4a** y **4c**, sin el efecto tóxico de estos últimos, lo cual revela el control positivo de la selectividad por la incorporación de átomo de bromo en el fragmento anilínico. Este efecto mostró ser positivo en estos derivados de pirrolidina y piperidina, que suelen ser tóxicos, pero se apreció un efecto contrario en el derivado de morfolino, donde el derivado **4e** mostró una menor selectividad que su correspondiente análogo **4b**. Por su parte, tomando como referencia derivados de morfolino del grupo de isoquina, **4b**, **4e**, **4k** y **4n**, puede notarse que los átomos de flúor y cloro en el fragmento anilínico no mejoran ni la actividad leishmanicida, ni selectividad, siendo algo posiblemente

extrapolable para derivados de piperidina y pirrolidina. Por tanto, el átomo de bromo mostró ser un modulador conveniente para incorporar en el fragmento anilínico de derivados de isoquina.

Por otra parte, analizando la actividad leishmanicida de los derivados de isotebuquina, obtuvimos seis compuestos promisorios (**10a**, **10b**, **10c**, **10e**, **10f** y **10j**). El derivado **10j** que se encuentra sustituido por el grupo 3-trifluórmethyl y piperidino como amino terminal presentó el mejor perfil dentro de la serie de isotebuquinas **10a-k**, mostrando buena actividad leishmanicida ($CE_{50} < 5 \mu M$), sin toxicidad a $20 \mu M$, *clearance*, sin problemas de solubilidad. Los compuestos **10a**, **10c** y **10f** aunque presentaron toxicidad a $20 \mu M$, tuvieron buena potencia leishmanicida a baja concentración, $CE_{50} \sim 1.25 \mu M$ e I.S. > 4 . Por su parte, los derivados restantes, de morfolina, (**10b** y **10e**), presentaron baja toxicidad (I.S. ≥ 2) y una potencia leishmanicida menor que el resto de derivados de isotebuquina con CE_{50} entre 5 y $10 \mu M$. El compuesto **10d** resultó tóxico a $20 \mu M$ y con actividad discreta ($CE_{50} \sim 5 \mu M$), mientras el resto de derivados, tres de ellos 4-trifluorometilados, **10g**, **10h** y **10i** y uno trifluorometilado, **10k**, resultaron no ser activos a $20 \mu M$. Estos resultados nos dejan a los derivados **10b**, **10j**, **10a**, **10c** y **10f** como los compuestos promisorios, destacando **10b** y **10j** como *hits*. Los compuestos **10a**, **10c** y **10f**, a pesar de tener un buen perfil leishmanicida, precipitan a $20 \mu M$ durante el ensayo.

Desde un punto de vista estructural analizando como función del sustituyente en anillo de fenilo extra y el grupo amino terciario terminal, es claro que la incorporación del sustituyente de 4-trifluórmethyl, si bien mejora la solubilidad, no genera compuestos activos independientemente de la funcionalidad del amino terciario no mostraron actividad a $20 \mu M$. La incorporación de 3-trifluórmethyl mejora el perfil, permitiendo reconocer al menos un derivado de piperidino activo (**10j**), siendo una funcionalidad muy atractiva ya que nos permitió reconocer uno de los compuestos *hits* de este trabajo. Por su parte, la incorporación de 3-flúorfenil y 4-flúorfenil en núcleos de isotebuquinas generó compuestos activos, aunque la funcionalidad de 3-flúorfenil generó compuestos tóxicos en dos de los tres casos analizados, mientras que la funcionalidad de 4-flúorfenil generó no sólo compuestos activos en el mismo rango que los de 3-flúorfenilo, sino con una baja o no apreciable toxicidad. Por tanto, podemos indicar que la selectividad leishmanicida se ve favorecida en los derivados de isotebuquina en el siguiente orden según la naturaleza del fenilo: 4-flúorfenil $>$ 3-flúorfenil (tóxicos) $>$ 3-trifluórmethylfenil $\gggg$ 4-fluórmethylfenil (no activos). Respecto al rol del grupo amino terciario terminal en derivados de isotebuquina, el grupo de morfolino, en general, generó compuestos menos activos que sus

análogos de pirrolidino o piperidino; sin embargo, los derivados de morfolinos no mostraron toxicidad, mientras los análogos de pirrolidino y piperidino fueron tóxico en varios casos. Un balance entre la funcionalidad lipofílica (fenilo) y el grupo amino terciario indica que los grupos de piperidina y pirrolidina genera compuestos más selectivos cuando se combinan con un grupo fenilo de baja toxicidad como 4-flúorfenilo o 3-trifluorfenilo. Por ejemplo, logramos identificar que la piperidina, un grupo que tiende a generar compuestos tóxicos al igual que el pirrolidino (ver **Tabla 14**), en combinación con grupo 3-trifluórmetilfenilo en derivados de isotebuquina deshidroxilada generó un compuesto (**10j**) no sólo selectivo, sino con una solubilidad favorable, siendo por tanto una combinación conveniente para la optimización química de estas isotebuquinas deshidroxiladas como agentes leishmanicidas.

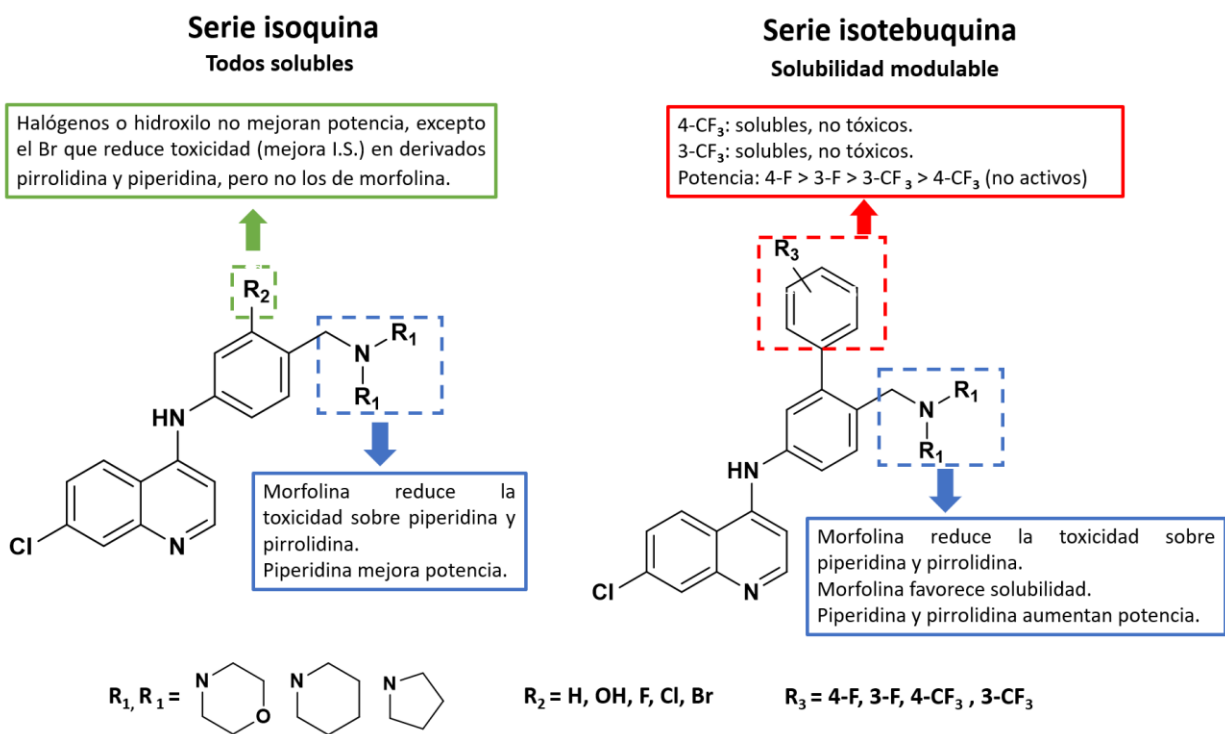


Figura 15. Relación estructura actividad cualitativo de las series de compuestos sintetizadas en este trabajo. La solubilidad del compuesto se refiere a la formación de cristales en el medio de cultivo, en las condiciones del ensayo.

Finalmente, realizamos un análisis sobre la lipofilia de los compuestos y la basicidad de los grupos protonables generales a todos los derivados (**Tabla 15**). Los datos se obtuvieron de cálculos *in silico* utilizando el software web de *Marvin Sketch* ^[46]. Esta información teórica busca mostrar,

en primer lugar, si nuestros derivados cumplen con los parámetros apropiados para alojarse en el fagolisosoma y, en segundo lugar, buscar una correlación entre la actividad leishmanicida y algunas de las dos propiedades. Del primer propósito, es posible notar que la mayoría de derivados mostraron valores de Log *P* entre 4 y 6 así como valores de constante de ionización ácida, *pK_a*, entre 4 y 10, los cuales son rangos de lipofilia y acidez claves para garantizar acumulación en lisosoma de acuerdo a las predicciones de Marceau^[13] y Trapp,^[12] respectivamente. Por otra parte, no se observó una correlación entre la lipofilia de los compuestos preparados y la basicidad del grupo amino terciario terminal con la actividad biológica. Esto puede ser o porque realmente en esta serie de derivados no exista esta relación y la actividad de los compuestos dependa de otros factores, o que los cálculos *in silico* no son representativos de valores experimentales, generando un error capaz de hacer perder la correlación de una variable con la otra.

Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas *in silico* de los compuestos evaluados **4a-f**, **4k**, **4n** y **10a-k**.

Compuesto	Log <i>P</i>	<i>pK_a</i> Amino terciario	<i>pK_a</i> Quinolina	Toxicidad versus macrófago humano a 20 μM (o a la concentración reportada, μM) ^a I.S.	Viabilidad parasitaria evaluada por bioluminiscencia (%) a la concentración reportada (μM) o ~ CE₅₀ (μM)
4a	4.51	9.23	6.51	I.S. > 2.5	34 ± 6 a 1
4b	3.45	7.13	6.39	I.S. > 16	CE₅₀ ~ 1.25
4c	4.12	9.37	6.51	Tóxico	No Activo a 5
4d	5.31	9.55	6.50	I.S. > 4	38 ± 8 a 5
4e	4.24	7.42	6.45	Tóxico	75 ± 7 a 5
4f	4.91	9.67	6.50	I.S. > 4	CE₅₀ ~ 2.5
4k	3.59	6.97	6.32	No Tóxico	63 ± 7 a 20
4n	3.97	6.92	6.30	I.S. >1	CE₅₀ ~ 20
10a	6.34	9.37	6.51	I.S. > 4	CE₅₀ ~ 1.25
10b	5.27	7.27	6.43	I.S. > 2	29 ± 3 a 10
10c	5.94	9.50	6.51	I.S. > 4	CE₅₀ ~ 1.25
10d	6.34	9.35	6.51	I.S. > 1	CE₅₀ ~ 5
10e	5.27	7.26	6.42	I.S. ~ 2	CE₅₀ ~ 10
10f	5.94	9.47	6.51	I.S. > 4	CE₅₀ ~ 1.25
10g	7.08	9.43	6.51	No Tóxico	No Activo
10h	6.02	7.32	6.43	No Tóxico	No Activo
10i	6.69	9.55	6.51	No Tóxico	No Activo
10j	7.08	9.41	6.51	I.S. > 4	20 ± 4 a 5
10k	6.02	7.3	6.43	No Tóxico	No Activo

^aToxicidad: se define un compuesto como **No Tóxico** si se mantienen adheridas más de un 80% de las células hospederas y **Tóxico** si se despegan más de un 80%, evaluada por microscopía de fluorescencia.
Índice de Selectividad (I.S.), concentración no tóxica/ aproximación a la **CE₅₀**.
CE₅₀ ~ X μM, significa que la viabilidad parasitaria es 50 ± 10% a la concentración X.
No Activo, significa que la viabilidad parasitaria es 100 ± 10% a 20 μM o a la concentración indicada, μM.
 CE₅₀ (Concentración Efectiva 50).

A partir de los resultados, se encontraron *hits*, dos del grupo de isoquinas (**4b**, **4d**) y dos del grupo de isotebuquina (**10b**, y **10j**). Los derivados (**4a**, **4f**, **10a**, **10c** y **10f**), aunque no cumplen la definición de *hit*, no se pueden descartar debido a su alta potencia.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo, se sintetizaron dos series de derivados de 4-aminoquinolinas enfocados en la modulación de la lipofilia y la basicidad, evaluar su actividad biológica en busca de encontrar nuevos compuestos con potencia leishmanicida e indagar si la actividad biológica se ve modificada por estas propiedades moleculares. En ese sentido, se obtuvieron 8 compuestos derivados de isoquina deshidroxilados y 11 compuestos derivados de isotebuquina deshidroxilados, y se evaluó su potencia leishmanicida y toxicidad sobre célula mamífera en un ensayo biológico contra la forma intracelular de *Leishmania infantum*. Entre los compuestos evaluados se encontraron cuatro *hits* con potencia leishmanicida destacable y baja toxicidad, además de otros cinco compuestos promisorios con destacable potencia, en algunos casos con potencia mayor al medicamento de estándar clínico actual de administración por vía oral (miltefosina). Además, se encontró una relación entre los grupos funcionales y la actividad leishmanicida, donde la amina terciaria terminal parece afectar en gran medida la potencia, y así también la toxicidad intrínseca del sistema, y donde las modificaciones en el sustituyente meta al grupo anilino parecen ser importantes para la modulación de la toxicidad y la solubilidad de los compuestos. Sin embargo, no se encontró una relación a priori con la basicidad y la lipofilia, dos aspectos importantes para la acumulación de los compuestos en compartimentos ácidos dentro de la célula como la vacuola parasitófora, el ácidocalsisoma del parásito, entre otros.

Los compuestos más activos abren una ventana para la evolución del sistema químico en la búsqueda de mayor potencia leishmanicida, pensando en aquellas modificaciones químicas que generaron mayor actividad, además de ser compuestos que podrían avanzar a estudios preclínicos más rigurosos como un cribado contra modelos de infección de macrófagos primarios, además de estudios toxicológicos más exigentes y modelos murino de eficacia terapéutica por imagenología

in vivo. Con la identificación de un líder, resulta de gran interés probar su acumulación en el fagolisosoma, además estudiar su mecanismo de acción o incluso la actividad de inmunoestimulación del macrófago.

En resumen, la síntesis y evaluación biológica de los compuestos sintetizados conllevó un avance en el conocimiento de nuevos derivados de isoquina e isotebuquina deshidroxilados. Esto representa un nuevo punto de partida para en la generación de nuevos sistemas activos contra *Leishmania infantum* en el estadio amastigota intracelular, y su optimización en la búsqueda de nuevas terapias contra la forma visceral de la leishmaniasis.

7. FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación estuvo sustentado por el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) mediante fondos de proyecto Despegue Científico 2023, la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) bajo fondos del proyecto I+D 2022 de código 22520220100622UD y el proyecto Fondo Faz Ferreira código FVF_2023_441.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] **(a)** M. Hide (2007). Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. *Encyclopedia of Infectious Diseases*, 2007, Chapter 6, 87–123. DOI:10.1002/9780470114209.ch6. **(b)** Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- [2] Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- [3] **(a)** World Health Organization (2023). *Leishmaniasis Fact Sheet*. Accessed 28 April 2023. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>). **(b)** Organización Panamericana de la Salud (2024). LEISHMANIASIS: informe epidemiológico de la Región de las Américas Núm. 13, diciembre 2024. Washington, D.C.: OPS. <https://www.paho.org/es/documentos/leishmaniasis-informe-epidemiologico-americas-num-13-diciembre-2024>
- [4] Mahboudi, F., Abolhassani, M., Tehrani, S. R., Azimi, M., & Asmar, M. (2002). Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species levels by PCR. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 34(10), 756–758. <https://doi.org/10.1080/0036554021000026930>

- [5] **(a)** M. Alegretti. Ministerio de Salud Pública, Dirección General de la Salud División Epidemiología (2022). Document 12/001/3/3754/2022. https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/2022-08/Respuesta%20y%20resoluci%C3%B3n%20Julio%20Medina_removed%20%281%29.pdf. **(b)** Satragno, D., Faral-Tello, P., Canneva, B., Verger, L., Lozano, A., Vitale, E., Greif, G., Soto, C., Robello, C., & Basmadjian, Y. (2017). Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay. *Emerging infectious diseases*, 23(3), 536–538. <https://doi.org/10.3201/eid2303.160377>
- [6] Zulfiqar, B., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2017). Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug discovery today*, 22(10), 1516–1531. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>
- [7] **(a)** Alves, F., Bilbe, G., Blesson, S., Goyal, V., Monnerat, S., Mowbray, C., Muthoni Ouattara, G., Pécou, B., Rijal, S., Rode, J., Solomos, A., Strub-Wourgaft, N., Wasunna, M., Wells, S., Zijlstra, E. E., Arana, B., & Alvar, J. (2018). Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00048-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00048-18>. **(b)** Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E. M., Ephros, M., Jeronimo, S., & Magill, A. (2016). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(12), 1539–1557. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw742>
- [8] **(a)** Drugs for Neglected Diseases initiative. 2023. Drug Discovery. <https://www.dndi.org/research-development/drug-discovery/>. Accessed 28 April 2023. **(b)** Drugs for Neglected Diseases initiative. 2023. Research-Development and portfolio. <https://www.dndi.org/research-development/portfolio>. Accessed December 2023. **(c)** Thomas, M., Brand, S., De Rycker, M., Zuccotto, F., Lukac, I., Dodd, P. G., Ko, E. J., Manthri, S., McGonagle, K., Osuna-Cabello, M., Riley, J., Pont, C., Simeons, F., Stojanovski, L., Thomas, J., Thompson, S., Viayna, E., Fiandor, J. M., Martin, J., Wyatt, P. G., ... Gilbert, I. H. (2021). Scaffold-Hopping Strategy on a Series of Proteasome Inhibitors Led to a Preclinical Candidate for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Journal of medicinal chemistry*, 64(9), 5905–5930. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00047> **(d)** Thomas, M. G., De Rycker, M., Ajakane, M., Albrecht, S., Álvarez-Pedraglio, A. I., Boesche, M., Brand, S., Campbell, L., Cantizani-Perez, J., Cleghorn, L. A. T., Copley, R. C. B., Crouch, S. D., Daugan, A., Drewes, G., Ferrer, S., Ghidelli-Disse, S., Gonzalez, S., Gresham, S. L., Hill, A. P., Hindley, S. J., ... Miles, T. J. (2019). Identification of GSK3186899/DDD853651 as a Preclinical Development Candidate for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Journal of medicinal chemistry*, 62(3), 1180–1202. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01218>
- [9] **(a)** Romero, A. H., & Delgado, F. (2025). 4-Aminoquinoline as a privileged scaffold for the design of leishmanicidal agents: structure–property relationships and key biological targets.

Frontiers in Chemistry, 12. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1527946> (b) Alvar, J., & Arana, B. (2017). Leishmaniasis, Impact and Therapeutic Needs. *The Royal Society of Chemistry eBooks* (pp. 1-23). <https://doi.org/10.1039/9781788010177-00001>

[10] (a) Senerovic, L., Opsenica, D., Moric, I., Aleksic, I., Spasić, M., & Vasiljevic, B. (2020). Quinolines and Quinolones as Antibacterial, Antifungal, Anti-virulence, Antiviral and Anti-parasitic Agents. *Advances in experimental medicine and biology*, 1282, 37–69. https://doi.org/10.1007/5584_2019_428 (b) Romero, A. H., Acosta, M. E., Gamboa, N., Charris, J. E., Salazar, J., & López, S. E. (2015). Synthesis, β -hematin inhibition studies and antimalarial evaluation of dehydroxy isotebuquine derivatives against *Plasmodium berghei*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(15), 4755–4762. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.040> (c) Valverde, E. A., Romero, A. H., Acosta, M. E., Gamboa, N., Henriques, G., Rodrigues, J. R., Ciangherotti, C., & López, S. E. (2018). Synthesis, β -hematin inhibition studies and antimalarial evaluation of new dehydroxy isoquine derivatives against *Plasmodium berghei*: A promising antimalarial agent. *European journal of medicinal chemistry*, 148, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.051> (d) Romero, A. H., López, S. E., Arvelo, F., Sojo, F., Calderon, C., & Morales, A. (2019). Identification of dehydroxy isoquine and isotebuquine as promising anticancer agents targeting K⁺ channel. *Chemical biology & drug design*, 93(4), 638–646. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13461>

[11] (a) Coimbra, E. S., Antinarelli, L. M., Silva, N. P., Souza, I. O., Meinel, R. S., Rocha, M. N., Soares, R. P., & da Silva, A. D. (2016). Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chemico-biological interactions*, 260, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.017> (b) Konstantinović, J., Videnović, M., Orsini, S., Bogojević, K., D'Alessandro, S., Scaccabarozzi, D., Terzić Jovanović, N., Gradoni, L., Basilico, N., & Šolaja, B. A. (2018). Novel Aminoquinoline Derivatives Significantly Reduce Parasite Load in *Leishmania infantum* Infected Mice. *ACS medicinal chemistry letters*, 9(7), 629–634. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00053> (c) Antinarelli, L. M., Souza, I. O., Glanzmann, N., Almeida, A. D., Porcino, G. N., Vasconcelos, E. G., da Silva, A. D., & Coimbra, E. S. (2016). Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinyldrazones derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Experimental parasitology*, 171, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.10.009>

[12] Trapp, S., Rosania, G. R., Horobin, R. W., & Kornhuber, J. (2008). Quantitative modeling of selective lysosomal targeting for drug design. *European biophysics journal: EBJ*, 37(8), 1317–1328. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0338-4>

[13] Marceau, F., Bawolak, M. T., Lodge, R., Bouthillier, J., Gagné-Henley, A., Gaudreault, R. C., & Morissette, G. (2012). Cation trapping by cellular acidic compartments: beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicology and applied pharmacology*, 259(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.004>

- [14] Carvalho, L., Luque-Ortega, J. R., López-Martín, C., Castanys, S., Rivas, L., & Gamarro, F. (2011). The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(9), 4204–4210. <https://doi.org/10.1128/AAC.00520-11>
- [15] **(a)** Rocha, V. P. C., Nonato, F. R., Guimarães, E. T., Rodrigues de Freitas, L. A., & Soares, M. B. P. (2013). Activity of antimalarial drugs *in vitro* and in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Journal of medical microbiology*, 62(Pt 7), 1001–1010. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.058115-0> **(b)** O'Neill, P. M., Mukhtar, A., Stocks, P. A., Randle, L. E., Hindley, S., Ward, S. A., Storr, R. C., Bickley, J. F., O'Neil, I. A., Maggs, J. L., Hughes, R. H., Winstanley, P. A., Bray, P. G., & Park, B. K. (2003). Isoquine and related amodiaquine analogues: a new generation of improved 4-aminoquinoline antimalarials. *Journal of medicinal chemistry*, 46(23), 4933–4945. <https://doi.org/10.1021/jm030796n> **(c)** O'Neill, P. M., Park, B. K., Shone, A. E., Maggs, J. L., Roberts, P., Stocks, P. A., Biagini, G. A., Bray, P. G., Gibbons, P., Berry, N., Winstanley, P. A., Mukhtar, A., Bonar-Law, R., Hindley, S., Bambal, R. B., Davis, C. B., Bates, M., Hart, T. K., Gresham, S. L., Lawrence, R. M., ... Ward, S. A. (2009). Candidate selection and preclinical evaluation of *N*-tert-butyl isoquine (GSK369796), an affordable and effective 4-aminoquinoline antimalarial for the 21st century. *Journal of medicinal chemistry*, 52(5), 1408–1415. <https://doi.org/10.1021/jm8012618>
- [16] Mukherjee, D., Yousuf, M., Dey, S., Chakraborty, S., Chaudhuri, A., Kumar, V., Sarkar, B., Nath, S., Hussain, A., Dutta, A., Mishra, T., Roy, B. G., Singh, S., Chakraborty, S., Adhikari, S., & Pal, C. (2020). Targeting the Trypanothione Reductase of Tissue-Residing *Leishmania* in Hosts' Reticuloendothelial System: A Flexible Water-Soluble Ferrocenylquinoline-Based Preclinical Drug Candidate. *Journal of medicinal chemistry*, 63(24), 15621–15638. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00690>
- [17] Razzaghi-Asl, N., Sepehri, S., Ebadi, A., Karami, P., Nejatkah, N., & Johari-Ahar, M. (2020). Insights into the current status of privileged *N*-heterocycles as antileishmanial agents. *Molecular diversity*, 24(2), 525–569. <https://doi.org/10.1007/s11030-019-09953-4>
- [18] Talukdar, A., Ganguly, D., Roy, S., Das, N., & Sarkar, D. (2021). Structural Evolution and Translational Potential for Agonists and Antagonists of Endosomal Toll-like Receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 64(12), 8010–8041. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00300>
- [19] Quiros Roldan, E., Biasiotto, G., Magro, P., & Zanella, I. (2020). The possible mechanisms of action of 4-aminoquinolines (chloroquine/hydroxychloroquine) against Sars-Cov-2 infection (COVID-19): A role for iron homeostasis?. *Pharmacological research*, 158, 104904. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104904>
- [20] **(a)** Romero, A. H., Rodríguez, N., López, S. E., & Oviedo, H. (2019). Identification of dehydroxy isoquine and isotebuquine as promising antileishmanial agents. *Archiv der Pharmazie*, 352(5), e1800281. <https://doi.org/10.1002/ardp.201800281> **(b)** Romero A. H. (2019). Role of Trifluoromethyl Substitution in Design of Antimalarial Quinolones: a Comprehensive

Review. *Topics in current chemistry (Cham)*, 377(2), 9. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0234-7> (c) A.H. Romero, et al. Dehydroxylated Isoquinines and Isotebuquinines as Potent and Selective Chemotherapeutic Agents Against Trypanosomatids: Role of the Lipophilicity, Protonation and Nanoencapsulation (en preparación)

[21] (a) Coimbra, E. S., Libong, D., Cojean, S., Saint-Pierre-Chazalet, M., Solgadi, A., Le Moyec, L., Duenas-Romero, A. M., Chaminade, P., & Loiseau, P. M. (2010). Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(12), 2548–2555. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq371> (b) López-Martín, C., Pérez-Victoria, J. M., Carvalho, L., Castanys, S., & Gamarro, F. (2008). Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(11), 4030–4036. <https://doi.org/10.1128/AAC.00964-08> (c) Sharma, N., Thomas, S., Golden, E. B., Hofman, F. M., Chen, T. C., Petasis, N. A., Schönthal, A. H., & Louie, S. G. (2012). Inhibition of autophagy and induction of breast cancer cell death by mefloquine, an antimalarial agent. *Cancer letters*, 326(2), 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.029> (d) Li, G., Zhu, D., Xue, L., & Jiang, H. (2013). Quinoline-based fluorescent probe for ratiometric detection of lysosomal pH. *Organic letters*, 15(19), 5020–5023. <https://doi.org/10.1021/ol4023547> (e) Kuo, H. H., Kakadiya, R., Wu, Y. C., Su, T. L., Lee, T. C., Lin, Y. W., & Yih, L. H. (2016). Derivatives of 6-cinnamamido-quinoline-4-carboxamide impair lysosome function and induce apoptosis. *Oncotarget*, 7(25), 38078–38090. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9348> (f) Fan, L., Nan, M., Ge, J., Wang, X., Lin, B., Zhang, W., Shuang, S., & Dong, C. (2018). Imaging of lysosomal pH changes with a novel quinoline/benzothiazole probe. *New Journal of Chemistry*, 42(16), 13479–13485. <https://doi.org/10.1039/c8nj02455c>

[22] Vogel, A. I., & Furniss, B. S. (2003). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. <http://182.160.97.198:8080/xmlui/handle/123456789/386>

[23] O'Neill, P. M., Harrison, A. C., Storr, R. C., Hawley, S. R., Ward, S. A., & Park, B. K. (1994). The effect of fluorine substitution on the metabolism and antimalarial activity of amodiaquine. *Journal of medicinal chemistry*, 37(9), 1362–1370. <https://doi.org/10.1021/jm00035a017>

[24] Rajesh, K., Somasundaram, M., Saiganesh, R., & Balasubramanian, K. K. (2007). Bromination of deactivated aromatics: a simple and efficient method. *The Journal of organic chemistry*, 72(15), 5867–5869. <https://doi.org/10.1021/jo070477u>

[25] Klapars, A., & Buchwald, S. L. (2002). Copper-catalyzed halogen exchange in aryl halides: an aromatic Finkelstein reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 124(50), 14844–14845. <https://doi.org/10.1021/ja028865v>

[26] Marcos, C. F., Neo, A. G., Díaz, J., & Martínez-Caballero, S. (2020). A Safe and Green Benzylic Radical Bromination Experiment. *Journal of Chemical Education*, 97(2), 582–585. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00020>

- [27] **(a)** Vázquez Sánchez, A., & Ávila Zárraga, J. G. (2007). Green Oxidation of Organic Compounds: Manganese Sulphate/Oxone®/Water. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 51(4), 213-216. **(b)** Vogel, A.; 1956, *Practical Organic Chemistry*, Longman Group Limited, London, Gran Bretaña.
- [28] **(a)** Burckhalter, J. H., & Tendick, F. H. (1946). Aminoalkylphenols as antimalarials; simple substituted alpha-aminocresols. *Journal of the American Chemical Society*, 68(10), 1894–1901. <https://doi.org/10.1021/ja01214a008>. **(b)** Romero, A.H., Delgado, F., Benítez, A., Gotopo, L. (2025). 4-Aminoquinoline: A Comprehensive Review about Synthetic Strategies. *Frontier in Chemistry*. DOI: 10.3389/fchem.2025.1553975.
- [29] **(a)** Miyaura, N., Yanagi, T., & Suzuki, A. (1981). The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synthetic Communications*, 11(7), 513-519. <https://doi.org/10.1080/00397918108063618> **(b)** Seidl, V., Romero, A. H., Heinemann, F. W., Scheurer, A., Vogel, C. S., Unruh, T., Wasserscheid, P., & Meyer, K. (2022). A New Class of Task-Specific Imidazolium Salts and Ionic Liquids and Their Corresponding Transition-Metal Complexes for Immobilization on Electrochemically Active Surfaces. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 28(20), e202200100. <https://doi.org/10.1002/chem.202200100>
- [30] Branchini, B. R., Ablamsky, D. M., Davis, A. L., Southworth, T. L., Butler, B., Fan, F., Jathoul, A. P., & Pule, M. A. (2010). Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications. *Analytical biochemistry*, 396(2), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.009>
- [31] Sousa, A. F., Gomes-Alves, A. G., Benítez, D., Comini, M. A., Flohé, L., Jaeger, T., Passos, J., Stuhlmann, F., Tomás, A. M., & Castro, H. (2014). Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. *Free radical biology & medicine*, 73, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.007>
- [32] **(a)** Benítez, D., Medeiros, A., Quiroga, C., & Comini, M. A. (2022). A Simple Bioluminescent Assay for the Screening of Cytotoxic Molecules Against the Intracellular Form of *Leishmania infantum*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2524, 127–147. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2453-1_10 **(b)** Benítez, D., Ortiz, C., Dibello, E., & Comini, M. A. (2024). Expanding the applications of a bioluminescent mouse infection model of acute African trypanosomiasis. *Frontiers in Chemical Biology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fchbi.2024.1433511>
- [33] Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., & Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and cell biology*, 142(3), 335–345. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1215-0>

- [34] Edelstein, A. D., Tsuchida, M. A., Amodaj, N., Pinkard, H., Vale, R. D., & Stuurman, N. (2014). Advanced methods of microscope control using μ Manager software. *Journal of biological methods*, 1(2), e10. <https://doi.org/10.14440/jbm.2014.36>
- [35] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- [36] Sui Y, Wu Z (2007) Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment. *Journal of Biomolecular Screening*. 2:229-234. <https://doi.org/10.1177/1087057106296498>
- [37] Zhang, J. H., Chung, T. D., & Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening*, 4(2), 67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>
- [38] Benítez, D., Franco, J., Sardi, F., Leyva, A., Durán, R., Choi, G., Yang, G., Kim, T., Kim, N., Heo, J., Kim, K., Lee, H., Choi, I., Radu, C., Shum, D., No, J. H., & Comini, M. A. (2022). Drug-like molecules with anti-trypanothione synthetase activity identified by high throughput screening. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 37(1), 912–929. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2045590>
- [39] Alcântara, L. M., Ferreira, T. C. S., Fontana, V., Chatelain, E., Moraes, C. B., & Freitas-Junior, L. H. (2020). A Multi-Species Phenotypic Screening Assay for Leishmaniasis Drug Discovery Shows That Active Compounds Display a High Degree of Species-Specificity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(11), 2551. <https://doi.org/10.3390/molecules25112551>
- [40] De Rycker, M., Hallyburton, I., Thomas, J., Campbell, L., Wyllie, S., Joshi, D., Cameron, S., Gilbert, I. H., Wyatt, P. G., Frearson, J. A., Fairlamb, A. H., & Gray, D. W. (2013). Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 2913–2922. <https://doi.org/10.1128/AAC.02398-12>
- [41] De Muylder, G., Ang, K. K., Chen, S., Arkin, M. R., Engel, J. C., & McKerrow, J. H. (2011). A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(7), e1253. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001253>
- [42] Benítez, D., Medeiros, A., Quiroga, C., Dibello, E., Aguilera, E., Bonilla, M., Comini, M. A. Generation and characterization of a *Leishmania infantum* bioluminescent line. Validation of a simple and robust bioluminescent assay to discover new cytotoxic drugs against the intracellular form of the parasite (en preparación).

- [43] Benítez, D., Ortiz, C., Dibello, E., & Comini M.A. (2024), Expanding the applications of a bioluminescent mouse infection model of acute African trypanosomiasis. *Frontiers in chemical biology*, 3, 1433511. <https://doi.org/10.3389/fchbi.2024.1433511>
- [44] Prolo, C., Estrada, D., Piacenza, L., Benítez, D., Comini, M. A., Radi, R., & Álvarez, M. N. (2021). Nox2-derived superoxide radical is crucial to control acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Redox biology*, 46, 102085. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102085>
- [45] Álvarez-Velilla, R., Gutiérrez-Corbo, M. D. C., Punzón, C., Pérez-Pertejo, M. Y., Balaña-Fouce, R., Fresno, M., & Reguera, R. M. (2019). A chronic bioluminescent model of experimental visceral leishmaniasis for accelerating drug discovery. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(2), e0007133. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007133>
- [46] Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, and calculation of properties, Marvin 19.21.7, Chemaxon (<https://www.chemaxon.com>).