



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE DE OXINDOLES  
ESPIROCÍCLICOS, ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE  
RESTRINGIDOS DE LA MELATONINA**

T E S I S

Que presenta

M. en C. DAPHNE EDITH GONZÁLEZ JUÁREZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directora de Tesis: Dra. Martha Sonia Morales Ríos

México, D. F.

DICIEMBRE, 2013

El presente trabajo se realizó en los Departamentos de Química y de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Martha Sonia Morales Ríos, en el marco del Programa de Posgrado en Farmacología, con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 207033.

## PUBLICACIONES

Martha S. Morales-Ríos, Daphne E. González-Juárez, Ernesto Rivera-Becerril, Oscar R. Suárez-Castillo, Pedro Joseph-Nathan. One-pot synthesis of conformationally restricted spirooxindoles. *Tetrahedron*, **2007**, 63 (32), 7702-7707.

Martha S. Morales-Ríos, Ernesto Rivera-Becerril, Daphne E. González-Juárez, Juan Benjamín García-Vázquez, Joel J. Trujillo-Serrato, Angelina Hernández-Barragán, Pedro Joseph-Nathan. Synthesis of pyrrolidinoindolines from 2-(2-oxo-3-indolyl)acetates: scope and limitations. *Natural Product Communications*, **2011**, 6 (4), 457-464.

Daphne E. González-Juárez, J.B. García-Vázquez, V. Zúñiga-García, J.J. Trujillo-Serrato, O.R. Suárez-Castillo, P. Joseph-Nathan, M.S. Morales-Ríos. Stereochemistry modulates the catalytic hydrogenolysis of nitrile-substituted cyclopropanes. *Tetrahedron*, **2012**, 68, 7187-7195.

## TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

Daphne E. González-Juárez, Martha S. Morales-Ríos, Ernesto Rivera-Becerril, Oscar R. Suárez-Castillo, Pedro Joseph-Nathan. Síntesis de oxindoles conformacionalmente restringidos. XLII Congreso Mexicano de Química, Guadalajara, Jalisco. *Bol. Soc. Quím. Mex.* **2007**, 1, Número especial, pág 90.

Daphne E. González-Juárez, Violeta Zúñiga-García, Juan Benjamín García-Vázquez, Oscar R. Suárez-Castillo, Pedro Joseph-Nathan, Martha S. Morales-Ríos. Antioxidant activity of new indoline-2-ones homologues of MLT. II Congreso de Radicales Libres y Estrés Oxidativo de la SMB, Taxco, Guerrero, 31 de marzo-3 de abril, **2009**.

Daphne E. González-Juárez, Juan Benjamín García-Vázquez, Violeta Zúñiga-García, Oscar R. Suárez-Castillo, Martha S. Morales-Ríos, Pedro Joseph-Nathan. Reducción de ciclopropanos nitril-sustituídos catalizada por Níquel-Raney, 46° Congreso Mexicano de Química, Querétaro, Qro. *Bol. Soc. Quím. Mex.* **2011**, 5, Número especial 2.

# ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. <b>ABSTRACT / RESUMEN</b>	1
2. <b>INTRODUCCIÓN</b>	3
2.1 <b>Química medicinal</b>	3
2.2 <b>Melatonina (MLT)</b>	4
2.2.1 Biosíntesis y metabolismo de la MLT	5
2.2.2 Mecanismo de acción de un fármaco	7
2.2.2.1 Efectos biológicos de la MLT independientes de receptor	8
2.2.2.2 Efectos biológicos de la MLT a través de receptor	8
2.3 <b>Estrés oxidativo</b>	11
2.3.1 Propiedades antioxidantes de la MLT	12
3. <b>OBJETIVOS</b>	14
3.1 <b>Objetivo general</b>	14
3.2 <b>Objetivos específicos</b>	14
4. <b>RESULTADOS QUÍMICOS Y DISCUSIÓN</b>	15
4.1 <b>Síntesis de espirociclopropiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano <i>anti/syn-5a-c</i></b>	16
4.1.1 Preparación y análisis estructural de espirociclopropiloxindoles sustituidos por un grupo nitrilo <i>anti/syn-2a-f</i>	16
4.1.1.1 Estudios por difracción de Rayos-X	18
4.1.1.2 Estudios computacionales	20
4.1.2 Preparación de 3-propionitriloxindoles <b>8a-c</b>	24
4.1.3 Preparación de 3-propilacetamidoxindoles <b>9a-c</b>	26
4.1.4 Preparación del 3-propilacetamidoindol <b>11a</b>	26
4.1.5 Preparación de 3-propilacetamidooxindoles <b>9a-c</b> y de espirociclopropiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano <i>anti-5a-c</i>	27

	<b>Página</b>
4.1.6 Preparación de espirociclopropiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano <i>syn-5a-c</i>	30
<b>4.2 Síntesis de espirociclopentiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano <i>anti/syn-6a</i> y <i>anti/syn-6f</i></b>	<b>32</b>
4.2.1 Preparación y análisis estructural de espirociclopentiloxindoles sustituidos por un grupo nitrilo <i>anti/syn-3e</i> y <i>anti/syn-3f</i>	32
4.2.2 Preparación y análisis estructural de los espirociclopentiloxindoles sustituidos por un grupo amidometano <i>anti-6a</i> , <i>syn-6a</i> , <i>anti-6f</i> y <i>syn-6f</i>	37
<b>4.3 Síntesis de espirociclohexiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano <i>anti-7a</i> y <i>syn-7a</i></b>	<b>42</b>
4.3.1 Preparación y análisis estructural de los espirociclohexiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano <i>anti-7a</i> y <i>syn-7a</i>	42
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE ENSAYOS DPPH Y BIOLÓGICOS</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Actividad antioxidante <i>in vitro</i></b>	<b>45</b>
5.1.1 Actividad antioxidante por el método DPPH	47
5.1.1.1 Determinación de la actividad captadora de radicales libres (ACRL) de los compuestos <i>anti</i> y <i>syn 5a–7a</i> , <b>11a</b> , MLT y trólox sobre el DPPH	48
<b>5.2 Estudios de citotoxicidad</b>	<b>55</b>
5.2.1 Ensayos de citotoxicidad	55
5.2.1.1 Reducción metabólica del MTT	56
5.2.1.2 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos <i>syn-5a</i> , <i>anti-6a</i> , <i>anti-7a</i> , <b>11a</b> y MLT por el método MTT	56
<b>5.3 Actividad antioxidante por el bio-ensayo DCFH-DA</b>	<b>62</b>
5.3.1 Producción de radicales $\cdot\text{OH}$ con cloruro férrico	63
5.3.2 Evaluación de la citotoxicidad del cloruro férrico	63

	<b>Página</b>	
5.3.3	Determinación de ERO generadas por cloruro férrico	64
5.3.4	Determinación del potencial anti- y pro-oxidante del trólox	65
5.3.5	Determinación del potencial antioxidante de los compuestos <i>syn-5a</i> , <i>anti-6a</i> , <i>anti-7a</i> y <b>11a</b>	68
5.3.6	Evaluación de la producción de ERO por MLT	72
6.	<b>CONCLUSIONES</b>	75
7.	<b>PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA</b>	76
7.1	<b>General</b>	76
7.2	<b>Mediciones por CG/EM</b>	76
7.3	<b>Determinación de los espectros de masa de alta resolución</b>	77
7.4	<b>Determinación de los espectros de RMN</b>	77
7.5	<b>Determinación de la estructura cristalina por difracción de rayos-X</b>	77
7.6	<b>Modelado Molecular</b>	78
7.7	<b>Procedimientos generales</b>	79
7.7.1	Espirociclización de 3-cianometiloxindoles	79
7.7.2	Reducción de espirociclopropanoxindoles con Ni-Raney/THF de <b>2a-c</b> , <b>2e</b> y <b>2f</b>	85
7.7.3	Reducción-acetilación de propanonitriloxindoles <b>8a-c</b> , <b>8e</b> y <b>8f</b>	87
7.7.4	Reducción-acetilación de espirooxindoles <i>anti-2a-f</i>	89
7.7.5	Reducción-acetilación de espirooxindoles <i>syn-2a-c</i>	93
7.7.6	Reducción-acetilación de espirociclopentanoxindoles en mezcla <i>anti/syn-3a</i> , <i>anti-3f</i> y <i>syn-3f</i>	96
7.7.7	Reducción-acetilación de espirociclohexanoxindoles <i>anti-4a</i> y <i>syn-4a</i>	97
7.7.8	Síntesis de la 3-propanacetamidaindol <b>11a</b>	98
7.7.9	Caracterización de sustratos iniciales, intermedios de síntesis y subproductos de reacción	100

<b>8.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL DE ENSAYOS DPPH Y BIOLÓGICOS</b>	<b>106</b>
<b>8.1</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>106</b>
8.1.1	Preparación de los compuestos	106
8.1.2	Método DPPH	106
8.1.2.1	Análisis de resultados	107
8.1.3	Cultivo celular	107
8.1.4	Método MTT	108
8.1.4.1	Análisis de resultados	109
8.1.5	Método DCFH-DA	109
8.1.5.1	Análisis de resultados	110
8.1.6	Análisis estadístico	110
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>111</b>
<b>10.</b>	<b>APÉNDICE</b>	<b>119</b>

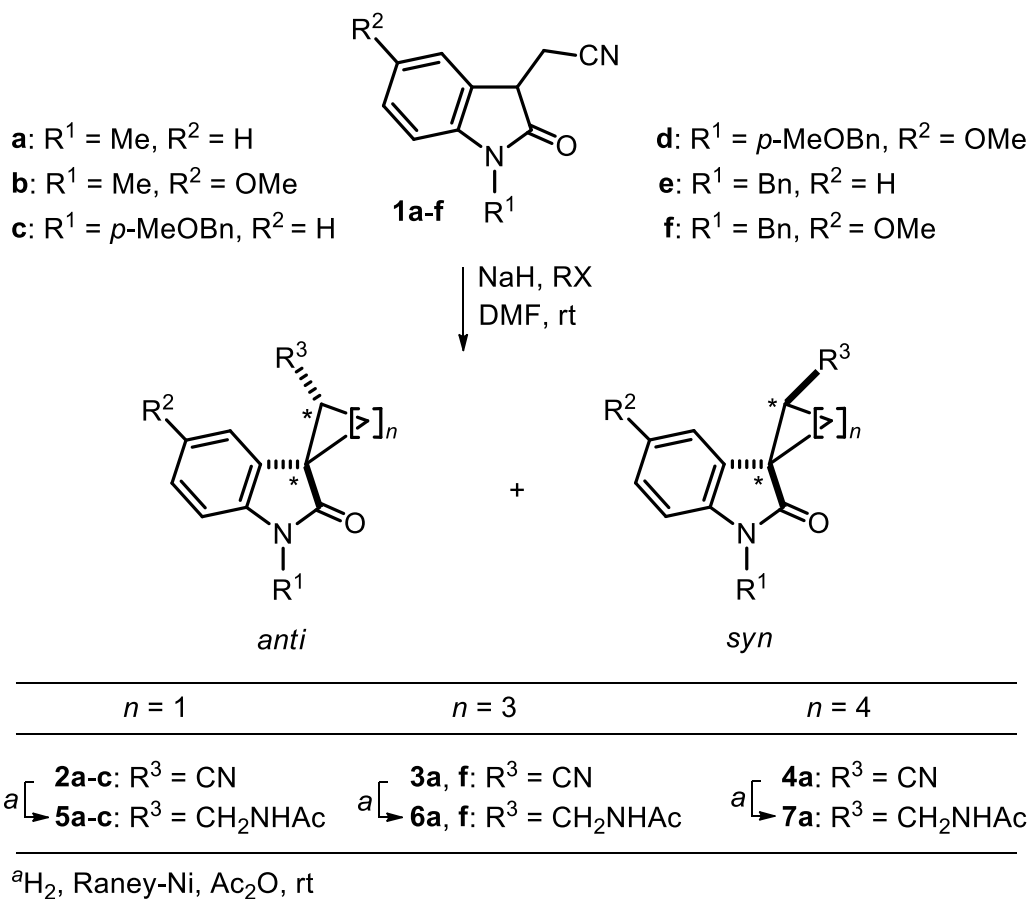


## 1. ABSTRACT

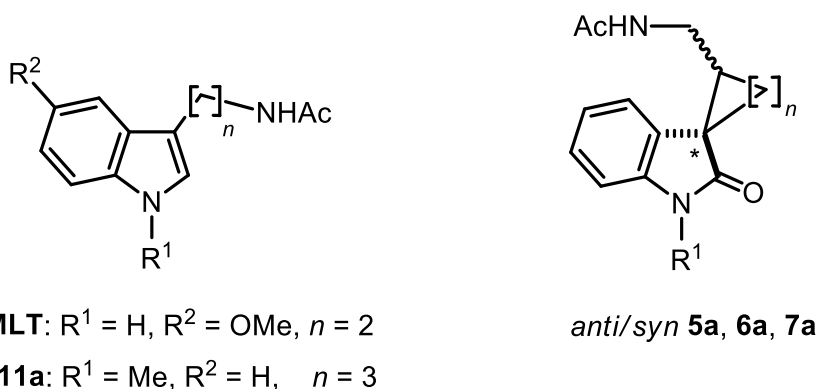
It has been well recognized that many biochemical reactions involve the generation of ROS (reactive oxygen species) in our body. However, under normal conditions, the balance between the generation and diminution of ROS is controlled by the antioxidant defense system. Under certain pathological conditions, when ROS are not effectively eliminated by the antioxidant defense system, the dynamic balance between the generation and diminution of ROS is broken. Excessive ROS attack lipids, carbohydrates, proteins, DNA, and result in oxidative stress, that leads to various disorders and diseases. In order to protect biomolecules against the attack of ROS and/or to suppress the resultant damage, synthetic antioxidants have been emerged in recent years.

Therefore, in the present work, a series of novel indole melatonin (MLT) analogues with a conformationally restricted C3 amidoethane side chain were designed, synthesized, and evaluated as potential antioxidants.

Following our previously reported procedure, diastereomeric nitrile-substituted cyclopropane **2a-c**, cyclopentane **3a**, **3e**, **3f** and cyclohexane **4a** derivatives were prepared from the corresponding oxindoles **1a-f**. Catalytic hydrogenation of diastereomeric (3*R*\*,9*R*\*)-*anti* and (3*R*\*,9*S*\*)-*syn* nitrile-substituted spiro[cycloalkyl-1,3-oxindoles] **2a-c**, **3a**, **3f** and **4a** gave the desired conformationally restricted amidomethane-substituted spiro[cycloalkyl-1,3-oxindoles] **5a-c**, **6a**, **6f** and **7a**. Hydrogenation was achieved in the presence of Raney-Ni using Ac<sub>2</sub>O as solvent. In order to rationalize the chemo- and regioselectivity occurring in the catalytic hydrogenolysis of diastereomeric nitrile-substituted spiro[cycloalkyl-1,3-oxindoles] **2a-c**, x-ray studies together with DFT calculations on the bond lengthening, the strain, and the charge distribution induced in the cyclopropyl ring by the geometrical changes were carried out in such compounds.



The anti-oxidant properties of diastereomeric *anti/syn* amidomethane-substituted spiro[cycloalkyl-1,3-oxindoles] **5a**, **6a** and **7a**, as well as for the homotriptamide **11a**, were investigated by the spectrophotometric 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging assay and a cell-based assay using DCFH-DA as a probe, and compared with MLT and the positive control trolox.



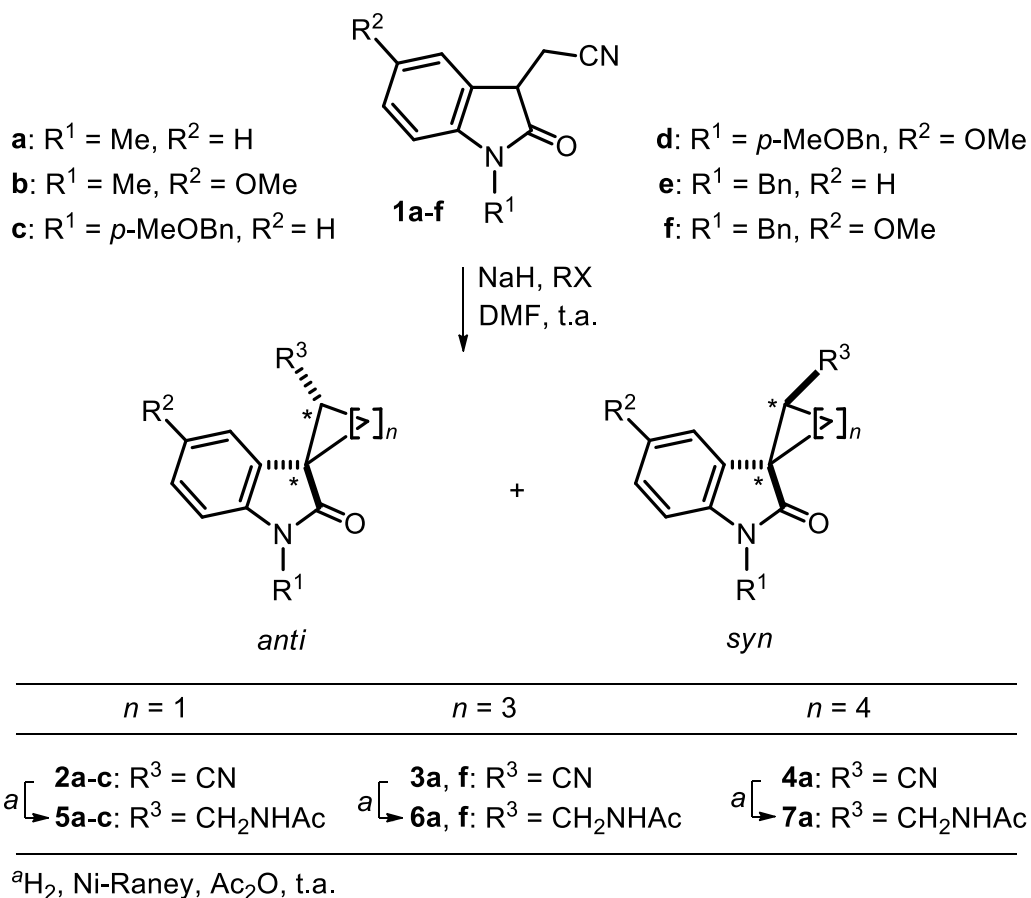
## 1. RESUMEN

En nuestro organismo como parte normal del metabolismo celular, se generan EROS (especies reactivas de oxígeno). En condiciones normales, el balance entre la generación y la disminución de EROS es controlado por un sistema de defensa antioxidante. Bajo ciertas condiciones patológicas, cuando las EROS no se eliminan de manera eficaz por el sistema de defensa antioxidante, el equilibrio dinámico entre la generación y disminución de EROS se rompe. El exceso de EROS daña a biomoléculas tales como lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN, causando estrés oxidativo, que conduce a diversos trastornos y enfermedades. Con el fin de proteger a las biomoléculas contra el daño oxidativo generado por EROS se han sintetizado en los últimos años diversos antioxidantes.

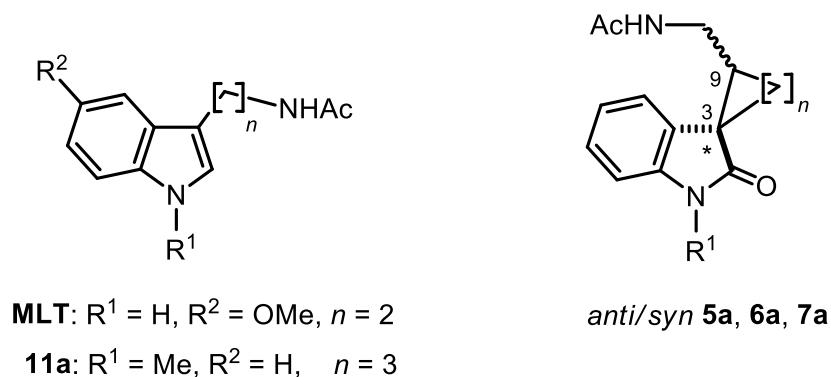
Por lo anterior, en el presente trabajo, se diseñó y evaluó como posibles agentes antioxidantes a una serie de análogos novedosos de la MLT, caracterizados por la limitación conformacional de la cadena *N*-acil-2-aminoetil.

Recientemente hemos descrito un método que conduce a la formación de espirocicloalquinoxindoles de tres-, cinco- y seis- miembros, por medio de un proceso de doble alquilación de 3-cianometiloxindoles. Siguiendo este proceso, a partir de los 3-cianometiloxindoles **1a-f**, se obtuvo una serie de espiro[cicloalquil-1,3-oxindoles] diastereoméricos ( $3R^*$ ,  $9R^*$ )-*anti* y ( $3R^*$ ,  $9S^*$ )-*syn* nitril-sustituidos **2a-c** (espirociclopropanos), **3a**, **3e**, **3f** (espirociclopentanos) y **4a** (espirociclohexano). La hidrogenación catalítica de **2a-c**, **3a**, **3f** y **4a** condujo a los espiro[cicloalquil-1,3-oxindoles] **5a-c**, **6a**, **6f** y **7a** conformacionalmente restringidos en la cadena lateral amidoetano.

Con el fin de analizar la influencia de la estereoquímica en la quimio- y regioselectividad que se observa en la hidrogenólisis catalítica de los espiro[cicloalquil-1,3-oxindoles] diastereoméricos **2a-c**, se realizaron estudios de rayos X junto con cálculos DFT, relativos al alargamiento de enlace, la tensión y distribución de carga.



Las propiedades antioxidantes de los pares diastereoméricos *anti/syn* amidoetanos **5a**, **6a** y **7a** con esqueleto base *N*-metil espirooxindol y de la *N*-acil homotriptamina **11a**, se evaluaron a través de dos estudios *in vitro* que incluyen el 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y la diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), comparándose con MLT y con trólox como control positivo.



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Química Medicinal

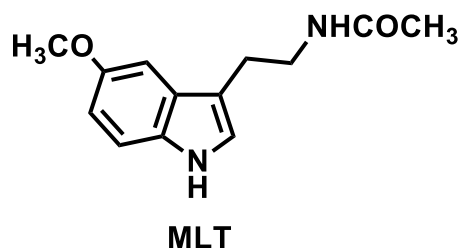
La química medicinal es una ciencia altamente interdisciplinaria que combina la química orgánica con la bioquímica, la química computacional, la farmacología, la farmacognosia, la biología molecular, la estadística y la química física. Se encarga de estudiar y aplicar todos aquellos conceptos de la química orgánica tradicional al desarrollo de sustancias que pudiesen contribuir de una u otra manera a las ciencias farmacéuticas con respecto a los efectos biológicos que las diversas sustancias químicas, generalmente heterocíclicas, pudiesen tener sobre el organismo humano.

En el diseño de fármacos los compuestos naturales han sido una de las grandes fuentes de fármacos prototipos. Existen datos que corroboran la importancia de los productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos, ya que más del 50% de los productos con éxito entre 1981 y 2005 forman parte de esta familia de productos. De hecho, no podemos olvidar que la diversidad de los productos naturales y su alta especificidad resultan de un complejo proceso de evolución molecular y de interacciones funcionales que se han dado en la naturaleza a lo largo de millones de años.

La búsqueda de nuevos medicamentos y de estructuras moleculares novedosas con fines terapéuticos se ha incrementado considerablemente en los últimos años. La existencia de enfermedades para las cuales no existen medicamentos efectivos, la resistencia de los agentes patógenos, los avances en las técnicas de biología molecular que han propiciado la identificación de un número cada vez mayor de moléculas "blanco" y la correlación de anomalías estructurales y funcionales a nivel de receptores y canales iónicos con diferentes patologías, son algunos de los factores que han acuciado el interés en la búsqueda de nuevos fármacos capaces de ejercer acciones específicas y potentes.

## 2.2 Melatonina (MLT)

La melatonina (N-acetyl-5-metoxitriptamina, MLT) es una neurohormona que podría denominarse "hormona de la oscuridad", que se sintetiza principalmente en la glándula pineal o epífisis en el núcleo supraquiasmático. Esta glándula en los humanos pesa alrededor de 150 mg y ocupa la depresión entre el colículo superior y la parte posterior del cuerpo calloso. Aunque existen conexiones entre la glándula pineal y el cerebro, aquella se encuentra fuera de la barrera hematoencefálica y está inervada principalmente por los nervios simpáticos que vienen de los ganglios cervicales superiores. Hoy en día se sabe que la MLT se sintetiza también en estructuras que curiosamente son tejidos en los cuales los radicales libres se encuentran en grandes concentraciones; tales como retina,<sup>1</sup> tracto gastrointestinal,<sup>2</sup> piel,<sup>3</sup> linfocitos,<sup>4</sup> y cerebro.<sup>5</sup> Datos sobre la expresión de RNA mensajero de dos enzimas responsables de la síntesis de MLT, arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), sugieren que incluso más órganos periféricos sean capaces de producir esta hormona.<sup>5</sup>

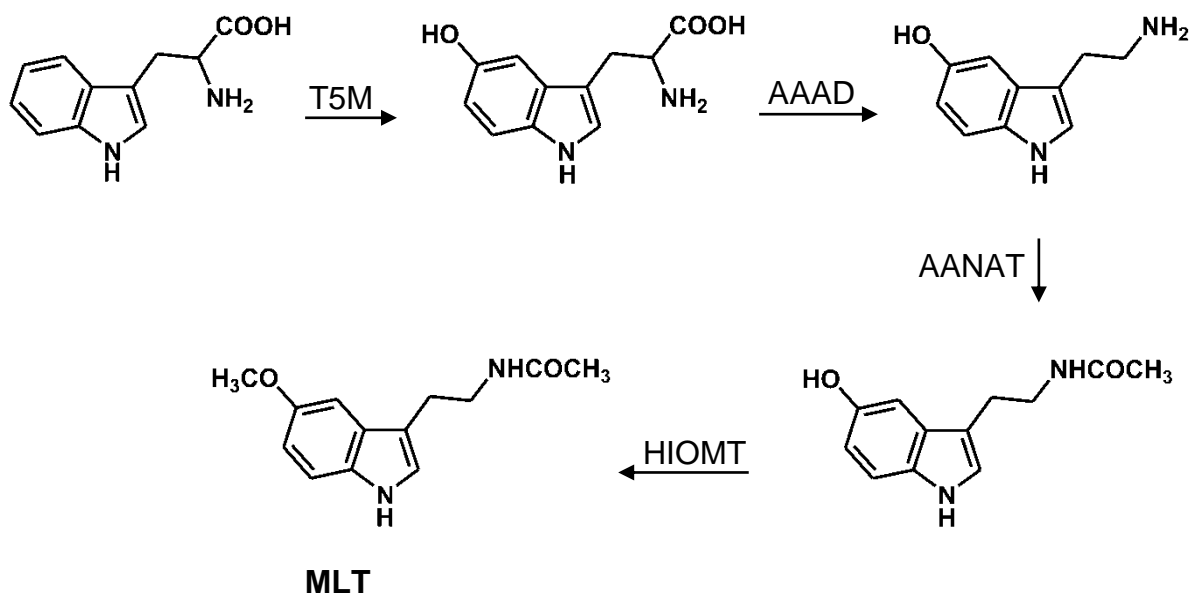


En todos los vertebrados, la producción de la MLT está relacionada con los ciclos luz-oscuridad, observándose un incremento en sus niveles sanguíneos durante la fase de oscuridad y una disminución de los mismos durante la fase de luz. El estímulo externo ambiental que determina la síntesis de MLT es traducido por un reloj circadiano endógeno que se encuentra en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo.<sup>6</sup>

La MLT es altamente lipofílica y por ello llega a muchas partes del organismo. Esta hormona está involucrada en numerosos procesos fisiológicos tales como ritmos circadianos, regulación de la presión sanguínea, oncogénesis, fisiología de la retina, reproducción estacional, fisiología de los ovarios, función inmune y más recientemente en la inducción de la diferenciación de osteoblastos.<sup>7</sup> El estudio de la MLT ha generado un gran interés farmacológico, ya que además se ha demostrado, mediante modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, que sus efectos antioxidantes los ejerce de manera directa e indirecta; siendo un antioxidante de amplio espectro, cuyo mecanismo de acción se lleva a cabo por una vía independiente de receptor.<sup>5</sup>

### 2.2.1 Biosíntesis y metabolismo de la MLT

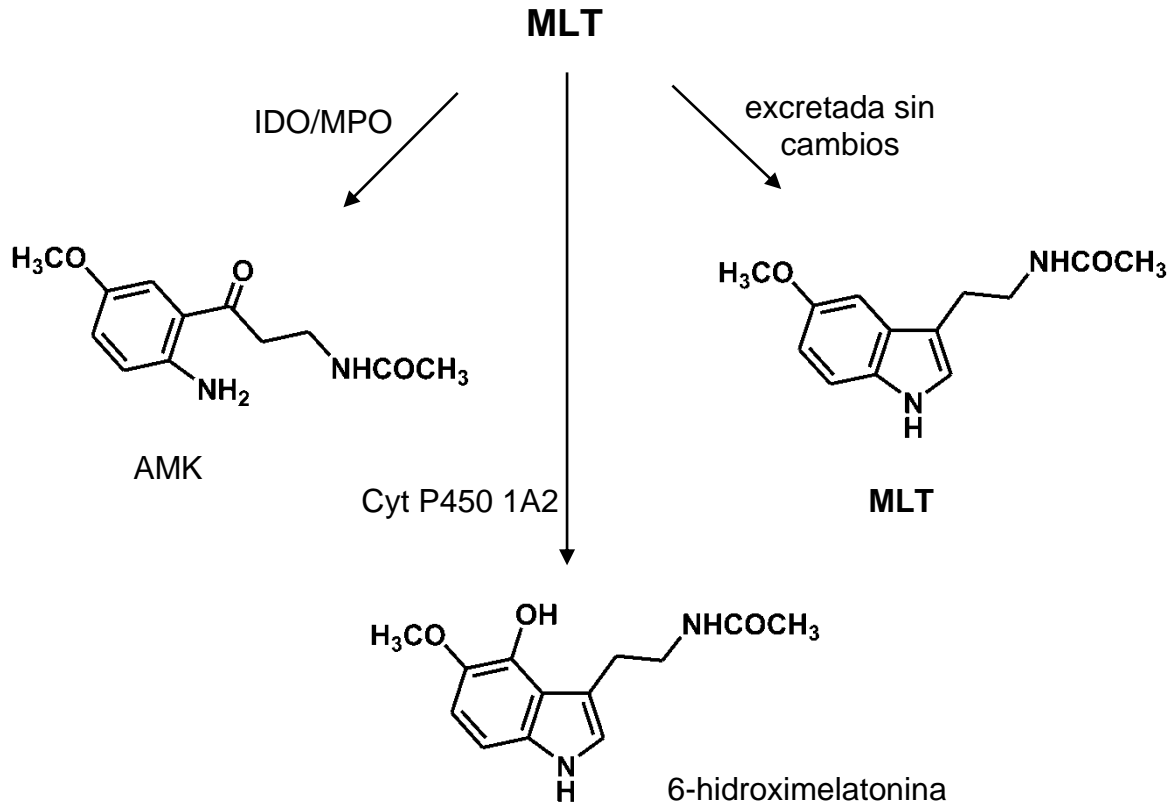
La MLT se sintetiza en una vía (Esquema 1) en la cual los primeros pasos involucran la hidroxilación del triptófano y la subsecuente descarboxilación. Esos procesos producen la formación de serotonina (5-HT), la cual es acetilada sobre la amina libre y después O-metilada sobre la posición 5-hidroxil. El paso limitante de este proceso es la alquilación de 5-HT, que es catalizada por la enzima arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT). Este proceso ocurre principalmente en la glándula pineal, donde se expresa la AANAT.



**Esquema 1.** Biosíntesis de la MLT. TM5, triptofano 5-monooxigenasa; AAAD, aminoácido aromático descarboxilasa; AANAT, arilalquilamina-*N*-acetiltransferasa; HIOMT, hidroxindol-*O*-metiltransferasa.

La MLT se elimina del organismo a través de dos procesos concomitantes, a) por medio de la clásica vía de hidroxilación, en la cual el citocromo P450 1A2 cataliza la formación de la 6-hidroximelatonina; esta puede conjugarse con sulfato o con ácido glucurónico para formar 6-sulfomelatonina o glucorónico 6-hidroximelatonina respectivamente; y b) alternativamente el centro indólico de la MLT es abierto durante la oxidación catalizada por indolamina-2,3-dioxigenasa y/o mieloperoxidasa. El compuesto formado durante este proceso es el intermediario inestable *N*1-acetil-*N*2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), que es deformilado al compuesto más estable *N*1-acetil-5-metoxikinuramina (AMK). Una proporción de la MLT se excreta sin cambios (Esquema 2).<sup>8</sup>





**Esquema 2.** Metabolismo de la MLT. IDO/MPO, indolamina 2,3-dioxigenasa/mieloperoxidasa; AMK, N1-acetil-5-metoxikinuramina; Cyt P450 1A2, citocromo P450 1A2.

### 2.2.2 Mecanismo de acción de un fármaco

La parte de la farmacología que estudia la acción de los fármacos y sus efectos es la farmacodinámica. La mayoría de los fármacos actúan modificando procesos celulares, ya sea que los estimule o los inhiba. También existen fármacos que no actúan sobre estructuras celulares, actúan o interaccionan físicoquímicamente sobre el medio, son los llamados de acción inespecífica, cuyo mecanismo de acción se basa en sus características físicas (absorbentes, protectores, etc.) o químicas (antiácidos, oxidantes, reductores, etc.) y no actúan frente a una molécula proteica diana.

### 2.2.2.1 Efectos biológicos de la MLT independientes de receptor

La mayoría de las drogas ejercen su acción por el reconocimiento de receptores, específicamente por tener la configuración molecular que se ajusta al dominio de unión del receptor. La selectividad de un fármaco por uno o varios órganos se fundamenta principalmente por la especificidad del medicamento al receptor diana. La MLT regula diversas funciones fisiológicas y neuroendócrinas, ya sea a través de la activación de sus receptores o bien de forma directa en orgánulos subcelulares. La MLT es ampliamente conocida por su capacidad antioxidante y depuradora de radicales libres, efectos antioxidantes que son independientes de receptor.

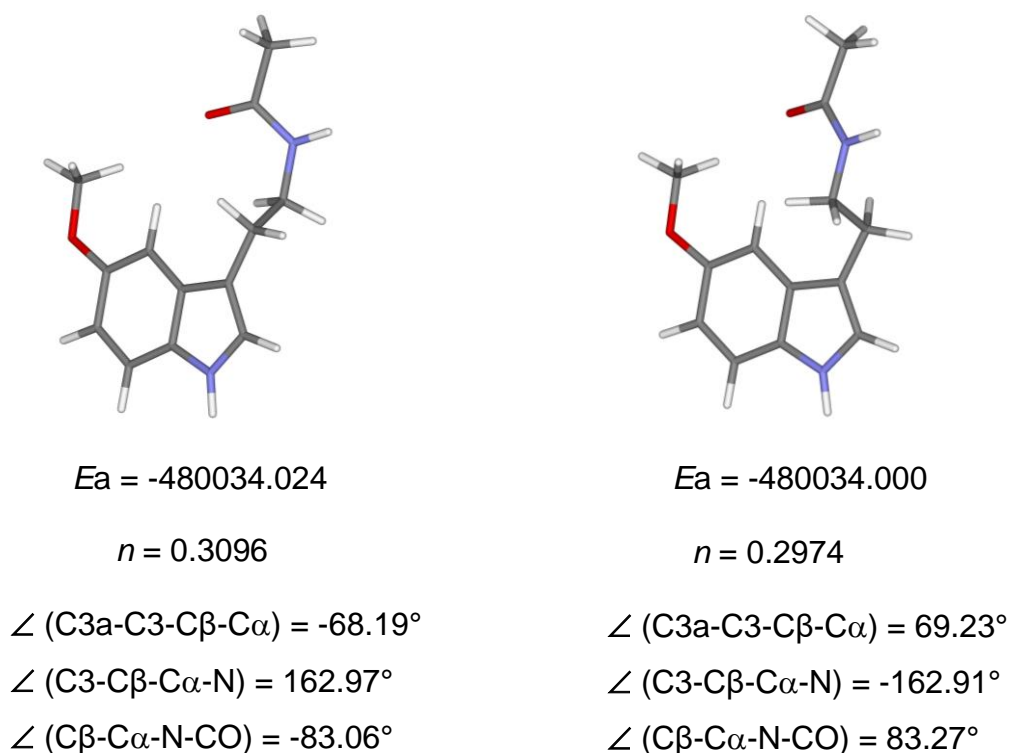
### 2.2.2.2 Efectos biológicos de la MLT a través de receptor

La MLT participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendócrinos y neurofisiológicos, tales como la regulación de la presión sanguínea, regulación del ritmo circadiano, oncogénesis, fisiología de la retina, reproducción estacional, fisiología de los ovarios, función inmune y recientemente la inducción de la diferenciación de osteoblastos. Estos efectos son mediados a través de su interacción con receptores denominados MT1, MT2 y MT3. Los dos primeros son receptores acoplados a proteína G y sus activaciones modulan una gran variedad de mensajeros secundarios como cAMP, cGMP, y  $[Ca^{2+}]_i$ . El sitio de unión del receptor MT3 se ha identificado como una proteína quinona reductasa cuya actividad fisiológica aún no se ha esclarecido.<sup>5</sup>

Los efectos que median estos receptores aún no son del todo claros. Sin embargo, se ha señalado que el receptor MT1 pudiera estar involucrado en la mediación de los ritmos circadianos y reproductivos por la MLT, ya que se expresa en el núcleo supraquiasmático y la pars tuberalis, que son considerados sitios de acción circadiana y estacional, respectivamente, de la MLT. Además, se ha descrito que MT1 puede mediar efectos que tienen que ver con el sueño, mientras que MT2 puede afectar la función del hipocampo en mamíferos.<sup>9</sup>

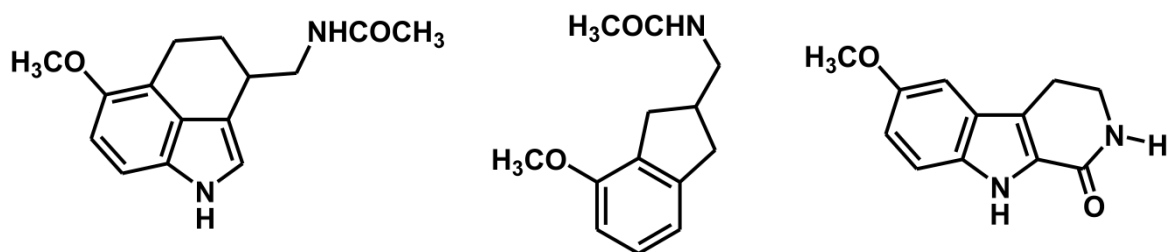
En los últimos años se ha incrementado el interés por desarrollar nuevas moléculas capaces de mimetizar o antagonizar los efectos de la MLT al interactuar con sus receptores con la finalidad de determinar, entre otras cosas, los parámetros estructurales implicados en el reconocimiento molecular por el receptor, importantes para la descripción del farmacóforo melatoninérgico.

La flexibilidad de la cadena *N*-acetil-2-aminoetil de la MLT le permite adoptar diferentes conformaciones energéticamente equivalentes que dificultan la posibilidad de asignar una conformación activa. Esta flexibilidad conformacional es quizá la responsable del amplio espectro de actividades biológicas de esta molécula. En la Figura 1 se muestran las estructuras de los 2 conformeros de menor energía de la MLT, de un total de 12 (encontradas utilizando el programa Spartan 04 Windows a nivel DFT B3LYP/6-31G (d)), la energía de activación ( $E_a$ , kcal/mol) y la población relativa en términos de fracción molar ( $n$ ).



**Figura 1.** Energía de activación y conformeros más estables de la MLT.

Asumiendo la relación entre la carencia de selectividad de la MLT y la libertad conformacional de la cadena *N*-acetil-2-aminoetil se han desarrollado diversas clases de compuestos conformacionalmente restringidos (Esquema 3), con el fin de obtener compuestos más selectivos y potentes que actúen como agonistas o antagonistas y sirvan a su vez como una herramienta importante para entender las funciones fisiológicas de los receptores de la MLT.<sup>10,11</sup>



**Esquema 3.** Análogos de la MLT conformacionalmente restringidos.

## 2.3 Estrés oxidativo

Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen un electrón desapareado dentro de su estructura. En la mayor parte de los casos, estas especies son altamente reactivas, tienen un tiempo de vida media menor a 1  $\mu$ seg, y se combinan para generar moléculas más estables. Estos juegan un papel muy importante en algunos procesos químicos, así como en diversos procesos biológicos tales como señalización celular, apoptosis y expresión genética. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) han sido de gran interés debido a su actividad en algunas enfermedades. Diversos estudios han demostrado que el principal origen de ERO es en la señalización redox a través de una familia de enzimas llamadas NADPH oxidasas. Actualmente se sabe que las ERO y ERN actúan de manera dual en las reacciones biológicas; ya sea como especies benéficas o dañinas. Las ERO incluyen diversos radicales libres tales como superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxilo ( $\bullet OH$ ), alcoxilo ( $RO\bullet$ ), peroxilo ( $RO_2\bullet$ ) e hidroperoxilo ( $RO_2H\bullet$ ); otras ERO tales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peróxidos lipídicos (LOOH), pueden ser convertidos en radicales libres por metales de transición. Las ERN incluyen principalmente óxido nítrico ( $NO\bullet$ ), dióxido de nitrógeno ( $NO_2\bullet$ ) y peroxinitrito ( $OONO^-$ ).<sup>12</sup>

El daño a tejidos celulares de animales o vegetales causados por ERO es llamado estrés oxidativo, el cual es producido por un desequilibrio entre la producción de ERO y la habilidad del sistema biológico para neutralizar los productos intermediarios reactivos o reparar el daño resultante. Dado que las ERO y ERN son altamente reactivas, éstas pueden reaccionar con moléculas orgánicas tales como lípidos, proteínas y ADN. La oxidación de estas biomoléculas puede dañarlas y ser responsables de diversas enfermedades.

Los radicales libres se forman principalmente como resultado normal del metabolismo celular, sin embargo se ha demostrado que en el organismo éstos incrementan cuando sus células se exponen en ambientes peligrosos, tales como

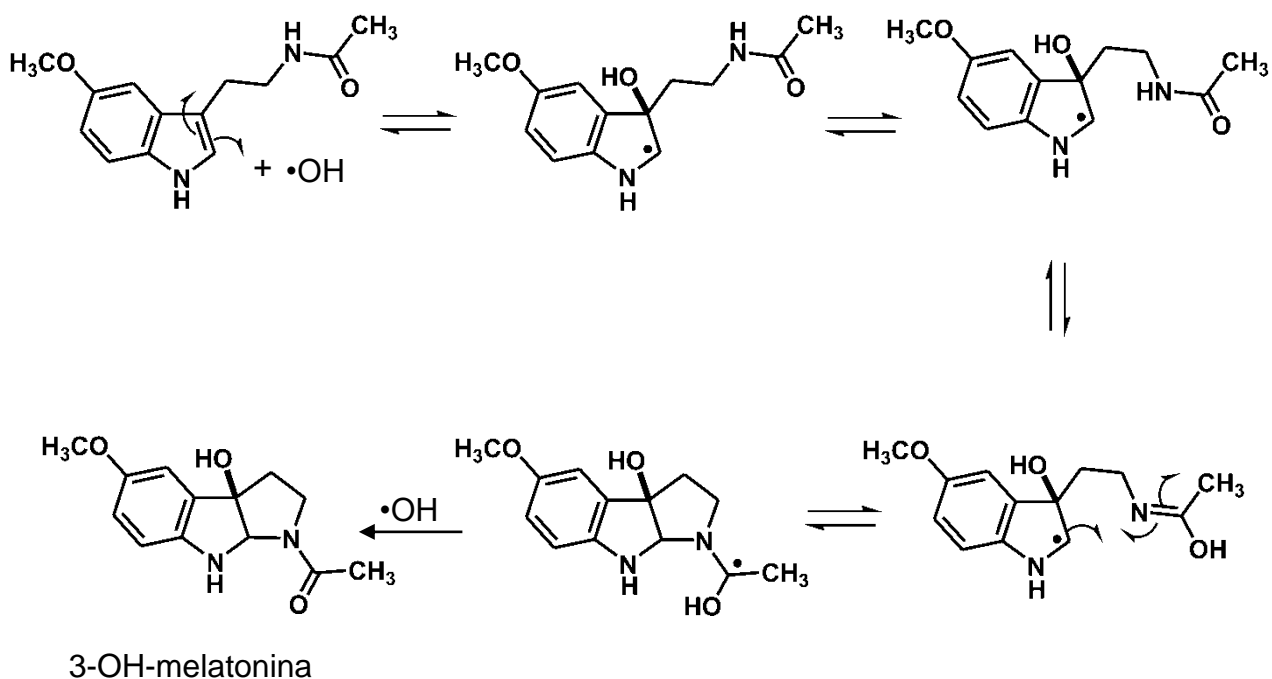
la contaminación, luz solar, radiación, estrés emocional, humo de tabaco, alcohol excesivo, infecciones o con algunos fármacos.

### 2.3.1 Propiedades antioxidantes de la MLT

La MLT es capaz de atravesar barreras biológicas como la placenta y la barrera hematoencefálica, en donde puede proteger de manera directa estructuras celulares a través de la reducción de los niveles de ERO y ERN o de manera indirecta incrementando las concentraciones de enzimas antioxidantes.<sup>13</sup> Por sus características físicas, como su alta lipofilicidad e hidrofiliicidad, su pequeño tamaño y su facilidad para concentrarse más en el núcleo que en el citoplasma ayuda a prevenir el daño oxidativo del ADN, enzimas y membranas biológicas.<sup>14</sup> Además se ha comprobado que la MLT tiene una función importante en la homeostasis y reducción del estrés oxidativo en la mitocondria.<sup>15</sup>

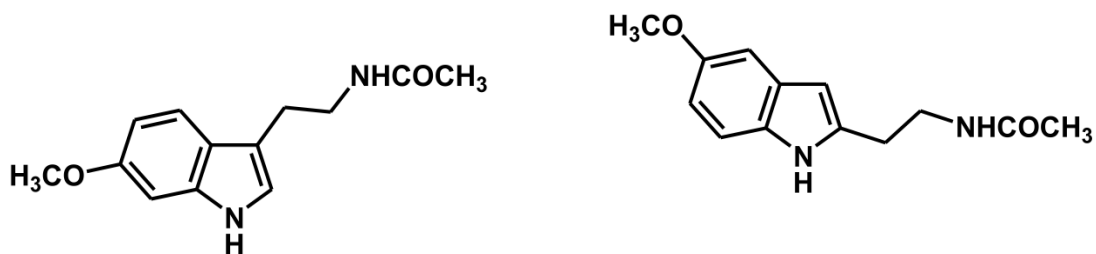
En los últimos años, se han investigado los antioxidantes, incluida la MLT, en relación con su papel dentro de las enfermedades de máximo impacto en occidente o países desarrollados, ya que la generación de radicales libres juega un papel muy importante en el progreso de muchos estados patológicos, como isquemia cerebral, inflamación,<sup>16</sup> arterosclerosis,<sup>17</sup> insuficiencia renal<sup>18</sup> y artritis reumatoide,<sup>19</sup> así como en el proceso natural del envejecimiento.<sup>20</sup>

Los mecanismos por medio de los cuales la MLT interacciona con los radicales libres no son del todo claros. Sin embargo, se sabe que esta molécula es efectiva en neutralizar especies reactivas de oxígeno (ERO), por dos razones: a) la alta afinidad y selectividad por ciertos radicales, en particular el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Esquema 4), y b) la generación de una reacción en cadena antioxidante, en la cual, los productos primarios y secundarios formados contribuyen a la eliminación de otros radicales.<sup>21, 22</sup>



**Esquema 4.** Reactividad de la MLT con el radical hidroxilo.

Por lo anterior, la síntesis de compuestos indólicos análogos a la MLT se encuentra bajo investigación para determinar aquellos que exhiban la mejor actividad con los menores efectos adversos. En la búsqueda de nuevos agentes antioxidantes, recientemente se han sintetizado diversos isómeros estructurales de la MLT en los que se ha modificado la posición del grupo metoxilo o la cadena lateral etilamido.<sup>23</sup>



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Realizar la síntesis y evaluación antioxidante de una serie de oxindoles espirocíclicos análogos de la MLT caracterizados por la restricción conformacional de la cadena 3-etilamido.

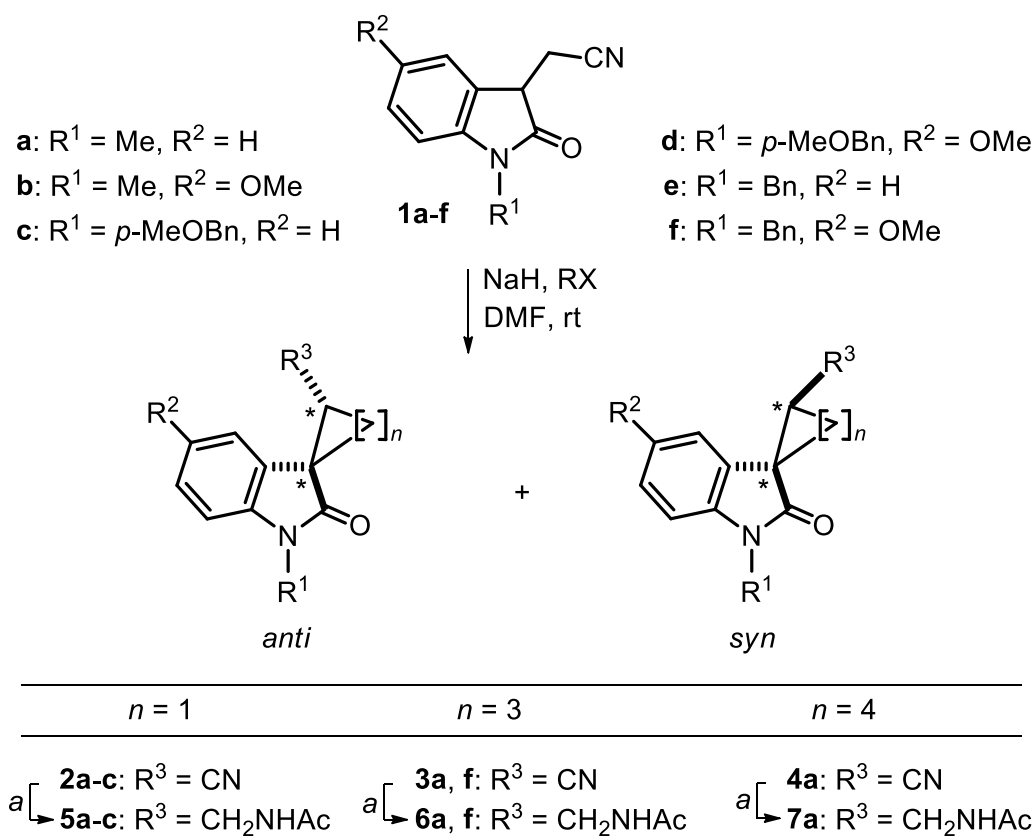
#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Investigar las condiciones generales para la síntesis de una serie homóloga de oxindoles espirocíclicos que incluye espirociclopropil-, espirociclopentil- y espirociclohexiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano.
2. Determinar la estereoquímica relativa y la conformación de los pares diastereoméricos de los oxindoles espirocíclicos sintetizados por espectrometría de masa, RMN 1D y 2D, difracción de rayos-X y modelado molecular.
3. Realizar un estudio de relación estructura-actividad antioxidante (SAR) por estudios *in vitro*, que incluyen:
  - a) Determinación de la actividad captora de radicales libres (ACRL) por el método DPPH.
  - b) Determinación del potencial antioxidante por el método DCFH-DA.



## 4. RESULTADOS QUÍMICOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se describe la síntesis de una serie de espirocicloalquiloxindoles acetamidometan-sustituídos *anti/syn-5a-c*, *anti-5d-f*, *anti/syn-6a*, *anti/syn-6f* y *anti/syn-7a* análogos de la MLT, conformacionalmente restringidos en la cadena lateral amidoetano en C3, a partir de 3-cianometiloxindoles **1a-f**. La representación de la estereoquímica de los espirocicloalquil oxindoles en los esquemas de esta tesis es similar a la usada con antelación en publicaciones.<sup>24,25</sup>



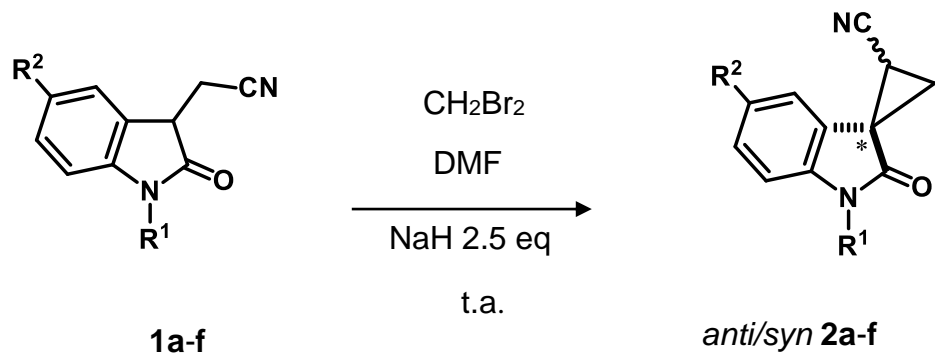
<sup>a</sup>H<sub>2</sub>, Raney-Ni, Ac<sub>2</sub>O, rt

## 4.1 Síntesis de espirociclopropil oxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano *anti/syn-5a-c*

Los ciclopropanos sustituidos por un grupo nitrilo constituyen una clase importante de compuestos debido a su papel como componentes estructurales de un número creciente de productos sintéticos más complejos que presentan propiedades de interés biológico y farmacológico. Una de las cualidades importantes de este tipo de compuestos es la restricción conformacional que el anillo de ciclopropano le confiere a la molécula en la cual es incorporado.<sup>26</sup> Como herramientas de síntesis, los ciclopropanos sustituidos por un grupo nitrilo han sido utilizados para la formación rápida de compuestos biológicamente activos, así como de derivados de ciclopropano funcionalizados.<sup>27</sup> De manera adicional se puede mencionar que la liberación de la tensión causada por la ruptura de ciclopropanos es utilizada frecuentemente en síntesis orgánica, constituyendo un método muy útil para la construcción de una gran variedad de esqueletos de carbono.

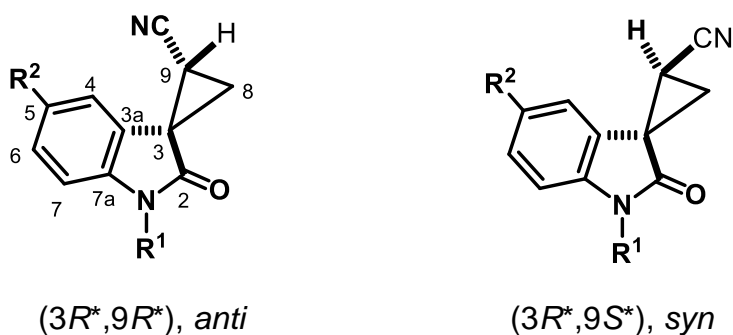
### 4.1.1 Preparación y análisis estructural de espirociclopropil oxindoles sustituidos por un grupo nitrilo *anti/syn-2a-f*

Recientemente se describió un método que conduce a la formación de espirocicloalquil oxindoles de tres, cinco y seis miembros; por medio de un proceso de doble alquilación de 3-cianometiloxindoles resultante del tratamiento con dibromoalcanos en medio alcalino.<sup>24</sup> Siguiendo este proceso, a partir de los 3-cianometiloxindoles **1a-f**, en donde R<sup>1</sup> puede ser Me, Bn y *p*-MeOBn y R<sup>2</sup> varía entre H y OMe, se obtuvo una serie de derivados de ciclopropanos sustituidos por un grupo nitrilo **2a-f** en mezclas diastereoméricas (Esquema 5). Estas mezclas diastereoméricas, resultantes de la formación de dos estereocentros contiguos en C3 y C9, fueron separadas fácilmente por cromatografía flash (CF) (Figura 2).



**Esquema 5.** Síntesis de espirociclopropanos sustituidos por un grupo nitrilo **2a-f** (para  $R^1$  y  $R^2$ , ver la Figura 2).

En todos los casos el compuesto menos polar ( $R_f$  mayor) y que resulta ser el más abundante, corresponde al isómero  $R^*,R^*$  (*anti*). La relación diastereomérica (rd)  $3R^*,9R^*/3R^*,9S^*$  varió entre 2:1 y 3:1 (Tabla 1). Además se corroboró que los compuestos termodinámicamente más estables son aquellos que poseen la estereoquímica *anti*.<sup>25</sup> Los compuestos *anti/syn 2a* y **2e** son conocidos.<sup>24,28</sup>



**2a:**  $R^1 = \text{Me}$ ,  $R^2 = \text{H}$

**2b:**  $R^1 = \text{Me}$ ,  $R^2 = \text{OMe}$

**2c:**  $R^1 = p\text{-MeOBn}$ ,  $R^2 = \text{H}$

**2d:**  $R^1 = p\text{-MeOBn}$ ,  $R^2 = \text{OMe}$

**2e:**  $R^1 = \text{Bn}$ ,  $R^2 = \text{H}$

**2f:**  $R^1 = \text{Bn}$ ,  $R^2 = \text{OMe}$

**Figura 2.** Estructuras de los diastereoisómeros *anti/syn-2a-f*.

**Tabla 1.** Síntesis de espiro[ciclopropil-1,3-oxindoles] **2a-f**

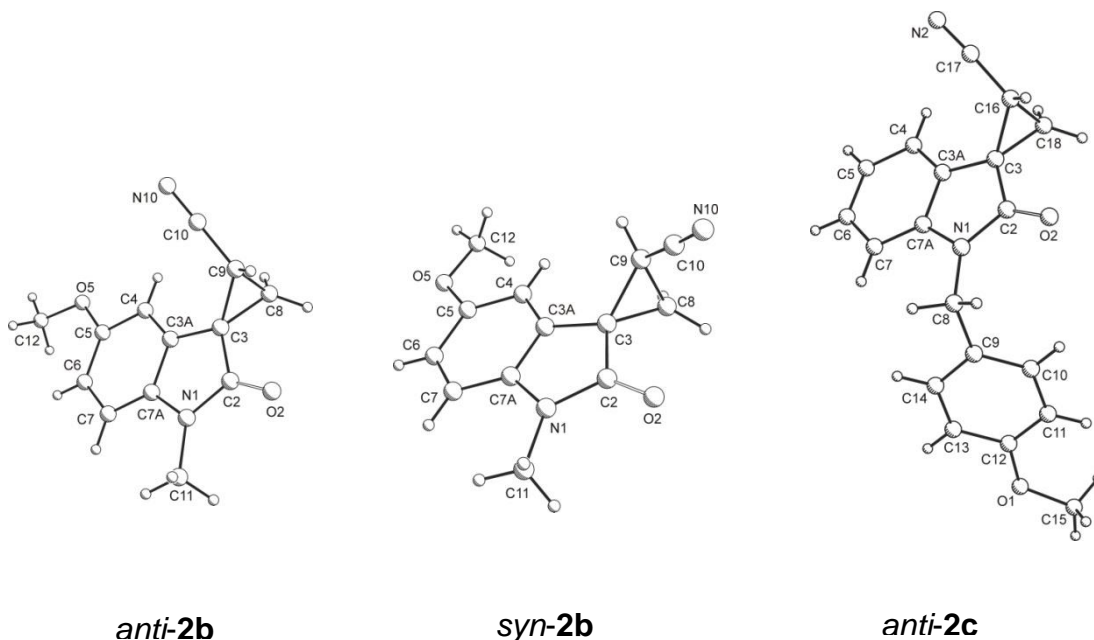
	Oxindol <b>2</b>	rd <sup>a</sup> <i>anti/syn 2</i>	Rendimiento <b>2</b> <sup>b</sup> (%)
1	<b>a</b>	2:1	91
2	<b>b</b>	3:1	84
3	<b>c</b>	3:1	84
4	<b>d</b>	2:1	83
5	<b>e</b>	2:1	83
6	<b>f</b>	3:1	86

<sup>a</sup>Determinado por CG/EM y/o RMN <sup>1</sup>H del crudo de reacción.

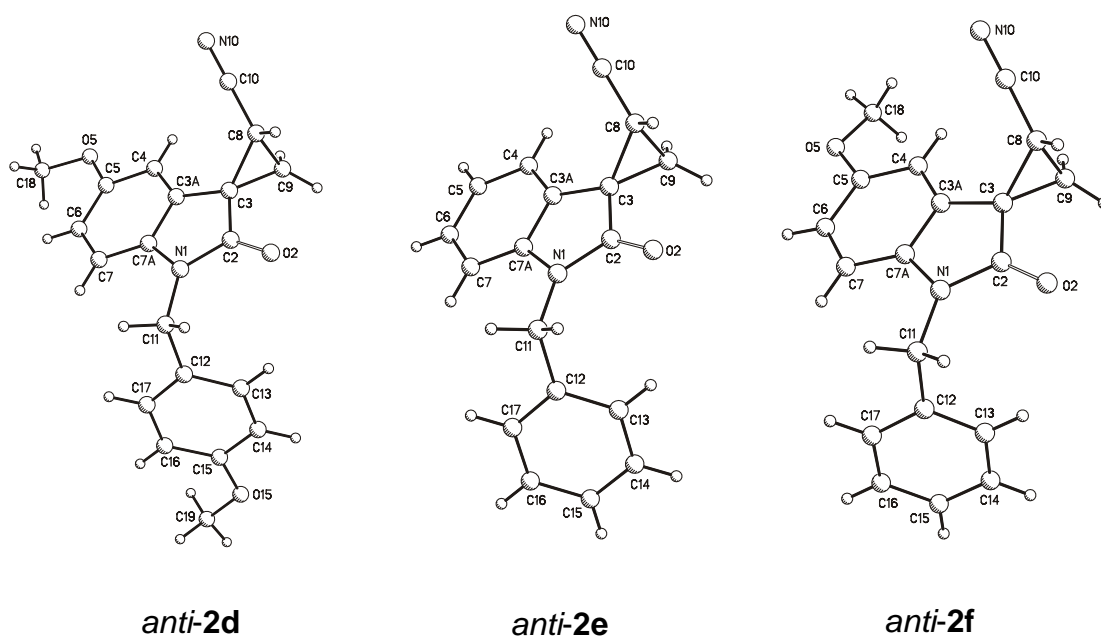
<sup>b</sup>Rendimiento total de la mezcla de *anti/syn-2*.

#### 4.1.1.1 Estudios por difracción de rayos-X

La asignación de la estereoquímica relativa de los diastereoisómeros *anti* y *syn 2a-2f* se basó en los efectos anisotrópicos de los grupos carbonilo y nitrilo sobre los desplazamientos químicos de H4 y H9, junto con la determinación de la proximidad espacial de H4, H8<sub>A</sub>, H8<sub>B</sub> y H9 por medio de estudios NOESY (<<nuclear Overhauser effect spectroscopy>>). Además, la estereoquímica relativa de los diastereoisómeros *anti-2b*, *syn-2b*, *anti-2c*, *anti-2d*, *anti-2e* y *anti-2f* se confirmó, por medio de su análisis cristalográfico de difracción de rayos-X (Figuras 3 y 4). Como se muestra en la Figura 2, el grupo 5-metoxilo del isómero *anti-2b* cristalizó en una conformación *s-trans* con respecto a H-4; mientras que en el isómero *syn* adopta una conformación *s-cis*. Dado que el grupo ciano es lineal, y la rotación interna del grupo carbonilo de la lactama con respecto al anillo de ciclopropano se encuentra restringida, no existe la posibilidad de conformaciones adicionales.



**Figura 3.** Estructuras moleculares de espiro[ciclopropil-1,3-oxindoles] de los isómeros *anti-* y *syn-2b* y *anti-2c* obtenidas por difracción de rayos-X.



**Figura 4.** Estructuras moleculares de espiro[ciclopropil-1,3-oxindoles] *anti-2d*, *anti-2e* y *anti-2f* obtenidas por difracción de rayos-X.

Las estructuras cristalinas de los diastereoisómeros *anti-2b* y *syn-2b* mostraron cambios geométricos y diferencias en las longitudes de los enlaces endocíclicos C-C del anillo de ciclopropano (C3-C8/C3-C9/C8-C9), con un promedio de 1.519 Å que es mayor que la longitud del enlace C-C de un ciclopropano no sustituido (1.503 Å). El enlace C3-C9 del anillo de tres miembros de estos compuestos es significativamente más largo por 0.020-0.025 Å, mientras que los enlaces C3-C8 y C8-C9 son más cortos por 0.005-0.015 Å. Estos resultados parecen ser un posible indicador de que el anillo de ciclopropano está conjugado con los grupos ciano y carbonilo de la lactama.<sup>29</sup>

Aunado a lo anterior, se encontró que el enlace C3-C9 en *syn-2b* es más largo por 0.005 Å que en el isómero *anti-2b* (ver 5 y 6, Tabla 2); concomitante con el decremento en el ángulo ( $\alpha$ ) del átomo de carbono espirocíclico (C8-C3-C9) de 59.05° en el isómero *anti* a 58.88° en el compuesto *syn* (Figura 2) lo que provoca un incremento en la tensión del anillo impuesto por factores geométricos en el isómero *syn-2b*. En vista de estos resultados, el siguiente objetivo fue investigar las propiedades estructurales y cuantificar las diferencias en estabilidad de los espirociclopropiloxindoles *anti*- y *syn-2a-c*.

#### 4.1.1.2 Estudios computacionales

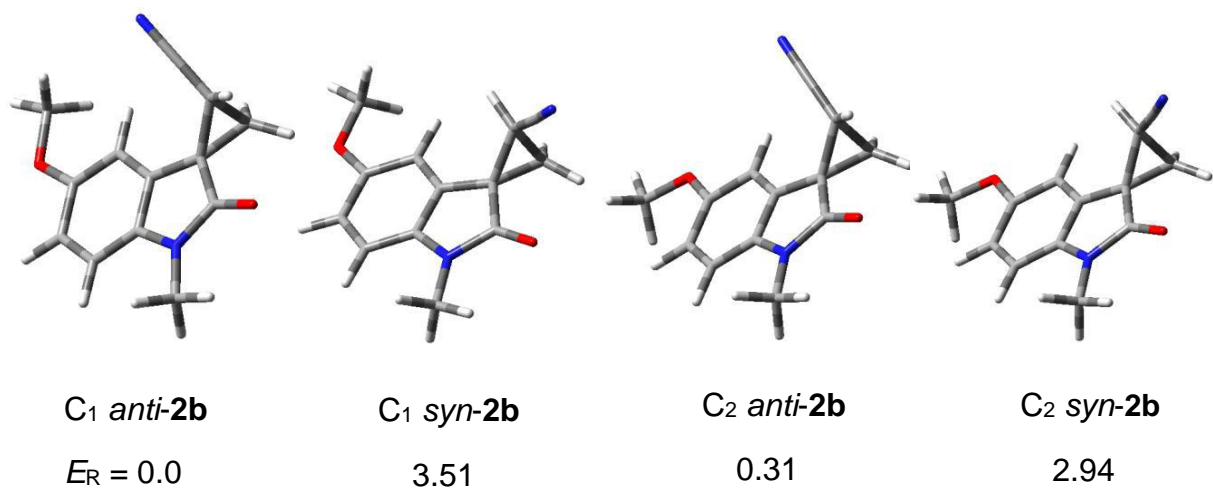
Con el objetivo de estudiar las propiedades estructurales y conformacionales de los derivados de nitrilciclopropano *anti* y *syn 2a-c* se llevó a cabo el cálculo de sus estructuras y estabildades relativas por medio de teoría de funcionales de la densidad (DFT de sus siglas en ingles) a un nivel de B3LYP/6-31G(d,p). La optimización geométrica en fase gaseosa resultó en una conformación estable para **2a**, dos para **2b** (C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>), y cuatro para los diastereoisómeros *anti* y *syn 2c*. Los parámetros estructurales asociados con el anillo de ciclopropano de **2a-c** del conformero más estable C1 se indican en la Tabla 2, para *anti* y *syn 2b* y **2c**.

Como se puede observar, los parámetros optimizados muestran variaciones relevantes entre los diastereoisómeros *anti* y *syn*. De acuerdo con el análisis cristalográfico por rayos-X, las estructuras optimizadas *anti* y *syn* **2a-c** muestran que la interacción donador-aceptor entre el anillo ciclopropano y el sistema- $\pi$  alarga significativamente el enlace C3-C9 en 0.04-0.05 Å, pero no afecta el largo de los otros dos enlaces C3-C8 y C8-C9, que varían de 0.01 a + 0.01 Å con respecto al valor de estos enlaces en un ciclopropano no sustituido (Tabla 2). Como era de esperar, el mayor efecto de alargamiento del enlace C3-C9 fue encontrado en los isómeros *syn*, por 0.001-0.002 Å, comparado con el alargamiento del enlace C3-C9 en los isómeros *anti* (Tabla 2).

En todos los casos, las estructuras optimizadas de los isómeros *anti-2a-c* parecen ser más estables que sus isómeros *syn*, con diferencias de energía entre ellos de 2.45 a 3.51 kcal/mol. Por lo tanto, desde el punto de vista termodinámico, los isómeros *anti* son más estables que sus contrapartes *syn* y esto concuerda con lo observado experimentalmente (Tabla 1). Las pequeñas diferencias de energía entre las conformaciones C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> de *anti-2b* y *syn-2b* (Figura 5) se atribuyen a la rotación del enlace simple del grupo metoxilo O-CH<sub>3</sub>, con ángulos diedros C4C5O5C12 cercanos a 0° para C<sub>1</sub> y a 180° para C<sub>2</sub>. Además, los ángulos diedros C2C3C9C10 correspondientes a los diastereoisómeros *anti* son del orden de -140°, mientras que los ángulos diedros C2C3C9C10 de los diastereoisómeros *syn* son de alrededor de -3°, consistente con los resultados cristalográficos.

Los cálculos por la teoría de funcionales de la densidad (Density Functional Theory, DFT de sus siglas en inglés) sugieren también que la orientación *synperiplanar* entre los grupos carbonilo y nitrilo puede resultar en un incremento en el momento dipolar ( $\mu$ , Tabla 2) de los espirociclopropiloxindoles correspondientes. La distribución de carga de Mulliken ( $q$ ), por DFT revela que en ambos diastereoisómeros, a medida que se acumula una carga más negativa sobre el carbono C8, el carbono espirocíclico C3 presenta una carga más positiva que el carbono C9. Además, la carga positiva sobre el carbono C3 aumenta de manera

significativa al pasar de los isómeros *anti* a los isómeros *syn*, mientras que para el carbono C9 se observa una situación inversa. También se evidencian cambios al pasar de los isómeros *anti* a los isómeros *syn* cuando se compara el aumento de la longitud del enlace C9-C10 con la disminución de la carga positiva en C10 (Tabla 2). En resumen, las observaciones anteriores predicen que los compuestos *syn-2a-c* deben ser más reactivos que los isómeros *anti*.



**Figura 5.** Estructuras moleculares calculadas de espiro[ciclopropil-1,3'-oxindoles] *anti-2b* y *syn-2b*.  $E_R$ : energía relativa calculada (kcal/mol).



**Tabla 2.** Energía relativa ( $E_R$ ),<sup>a</sup> longitudes de enlace seleccionados,<sup>a,b</sup> momento dipolar ( $\mu$ ),<sup>a</sup> y cargas de Mulliken ( $q$ ),<sup>a</sup> para *anti* y *syn* **2a-c**.

		$E_R^c$	Longitud de enlace (Å)				$\mu$ (Debye)	Carga ( $q$ )			
			C3-C8	C3-C9	C8-C9	C9-C10		C3	C8	C9	C10
1 <sup>a</sup>	<i>anti-2a</i>	0.0 <sup>d</sup>	1.509	1.542	1.507	1.440	4.19	+0.235	-0.427	+0.071	+0.088
2 <sup>a</sup>	<i>syn-2a</i>	2.86	1.508	1.543	1.505	1.443	6.55	+0.622	-0.509	+0.038	+0.007
3 <sup>a</sup>	C <sub>1</sub> <i>anti-2b</i>	0.0 <sup>e</sup>	1.509	1.541	1.507	1.440	3.17	+0.531	-0.440	+0.064	+0.082
4 <sup>a</sup>	C <sub>1</sub> <i>syn-2b</i>	3.51	1.507	1.543	1.506	1.443	6.58	+0.955	-0.523	+0.025	+0.004
5 <sup>b</sup>	<i>anti-2b</i>	-	1.498	1.523	1.489	-	-	-	-	-	-
6 <sup>b</sup>	<i>syn-2b</i>	-	1.498	1.528	1.488	-	-	-	-	-	-
7 <sup>a</sup>	C <sub>1</sub> <i>anti-2c</i>	0.0 <sup>f,g</sup>	1.509	1.543	1.507	1.440	3.01	+0.441	-0.367	+0.266	0.000
8 <sup>a</sup>	C <sub>1</sub> <i>syn-2c</i>	2.45 <sup>f</sup>	1.507	1.544	1.505	1.442	5.13	+0.674	-0.455	+0.078	-0.043
9 <sup>b</sup>	<i>anti-2c</i>	-	1.507	1.529	1.493	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Datos calculados a nivel B3LYP/6-31G(d,p).

<sup>b</sup>Datos de rayos-X.

<sup>c</sup>Energía relativa calculada (kcal/mol).

<sup>d</sup> $E_a = -648.045735$  au.

<sup>e</sup> $E_a = -762.572717$  au.

<sup>f</sup>Para el confórmero más estable.

<sup>g</sup> $E_a = -993.639213$  au.

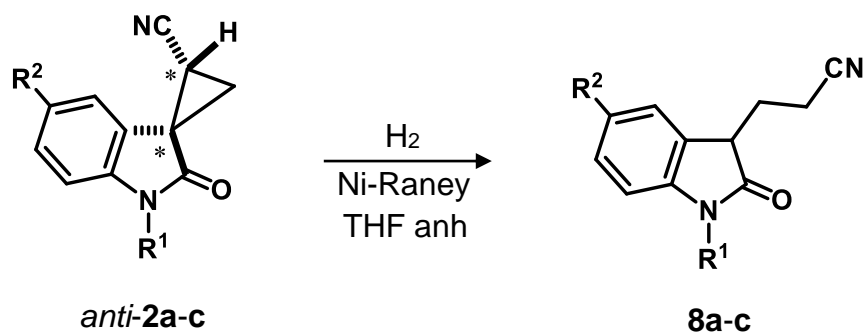
#### 4.1.2 Preparación de 3-propionitriloxindoles **8a-c**

Aunque la reducción de ciclopropanos sustituidos por un grupo nitrilo con LiAlH<sub>4</sub> se ha descrito,<sup>30</sup> en este caso todos los intentos para reducir el grupo nitrilo a la amina, usando como sustrato el espirociclopropiloxindol *anti-2a* fueron infructuosos. En ninguna de las reacciones se detectaron espirociclopropiloxindoles sustituidos por un grupo amidometano o productos reconocibles, excepto el sustrato inicial. Cuando la reducción se realizó en presencia de una base acuosa se recuperó una mezcla de epimeros *anti/syn*. La epimerización de *anti-2a* puede atribuirse a la formación de un carbanión intermediario en C9 del anillo de ciclopropilo que se estabiliza por el efecto inductivo del grupo ciano.<sup>31</sup>

De manera alterna, se examinó la hidrogenación catalítica de los ciclopropanos sustituidos por un grupo nitrilo utilizando Ni-Raney.<sup>32</sup> Los resultados indicaron que a 3 atm, a temperatura ambiente en THF y durante 5 h, la conversión del espiro[ciclopropil-1,3-oxindol] *anti-2a* ocurrió en un 80% (Tabla 3). De la mezcla de reacción se aisló, en un modesto 31% de rendimiento, el 3-propionitriloxindol **8a**, resultante de la apertura regioselectiva del anillo espirociclopropano, junto con el sustrato inicial y productos no identificados. Modificaciones en las condiciones de reacción como el aumento del tiempo de reacción resultó perjudicial para el rendimiento de **3a**. Una ligera mejora en el rendimiento se llevó a cabo a menor presión (2.1 atm) y con un tiempo de reacción prolongado (24 h) produciendo **8a** en un 40% de rendimiento junto con productos no caracterizados y trazas de *anti-2a*.

La hidrogenación catalítica de los espiro[ciclopropil-1,3-oxindol] *anti-2b* y *anti-2c* usando las condiciones iniciales de reacción, 3 atm (44 psi) y 5 h causó la ruptura exclusiva del enlace C3-C9 del anillo de ciclopropano para formar los correspondientes propionitriloxindoles **8b** y **8c** con rendimientos del 37% y 45% (3 y 4, Tabla 3).

**Tabla 3.** Hidrogenólisis de los espiro[ciclopropil-1,3-oxindoles] *anti-1a-c*<sup>a,b</sup> con Ni-Raney en THF.



	Espirooxindol <b>2</b>	Presión (atm) <sup>c</sup>	Rendimiento <b>8</b> (%)	Conversión <sup>d</sup> (%)
1	<b>a</b>	3	31	80
2	<b>a</b>	2.3 <sup>e</sup>	40	>95
3	<b>b</b>	3	37	77
4	<b>c</b>	3	45	81

<sup>a</sup>Para R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> ver Figura 2.

<sup>b</sup>30 mg de sustrato por mL de THF anh, 200% en peso del catalizador, 5 h, t.a

<sup>c</sup>1 atm = 14.7 psi (<<pound per square inch>>)

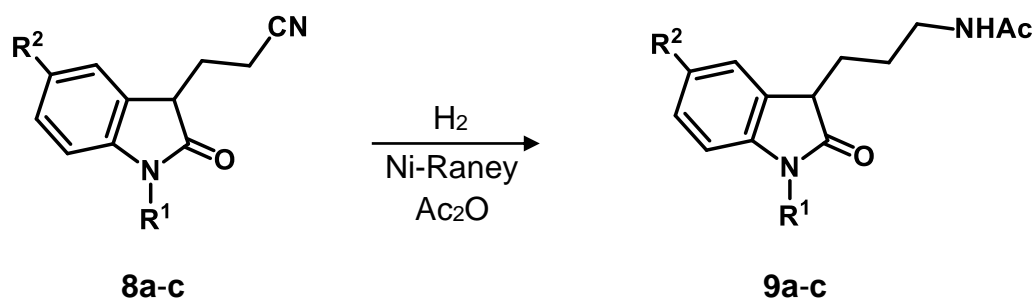
<sup>d</sup>Del sustrato.

<sup>e</sup>Durante 24 h.

Estos resultados sugieren que el alargamiento y por lo tanto debilitamiento del enlace C3-C9 del anillo de ciclopropano es un factor determinante en la apertura regioselectiva de los espiro[ciclopropil-1,3-oxindoles] *anti-2a-c*. Estos resultados estan de acuerdo con las observaciones anteriores respecto a la apertura regioselectiva de nitrilciclopropanos como resultado de un alto nivel de asimetría en la longitud de sus enlaces endocíclicos inducida por los sustituyentes,<sup>33</sup> junto con el análisis por rayos-X y las aproximaciones teóricas por cálculos DFT.

#### 4.1.3 Preparación de 3-propilacetamido oxindoles **9a-c**

La síntesis de la serie de 3-propilacetamidooxindoles **9a-c** se llevó al cabo por hidrogenación catalítica de los 3-propionitriloxindoles **8a-c** que por una subsecuente reducción-acetilación del grupo ciano en presencia de Ni-Raney en  $\text{Ac}_2\text{O}$  generó los 3-propilacetamidooxindoles deseados **9a-c** en rendimientos del 70-75% (Esquema 6).

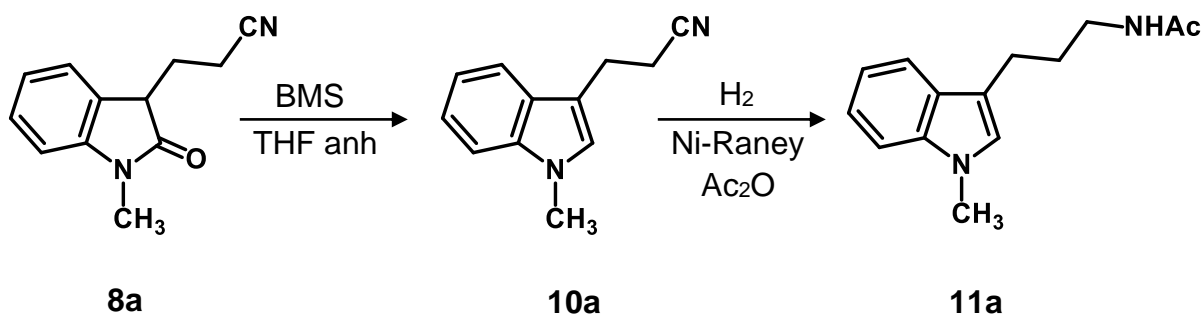


**Esquema 6.** Hidrogenación catalítica de los 3-propionitriloxindoles **8a-c** con Ni-Raney en  $\text{Ac}_2\text{O}$ .

#### 4.1.4 Preparación del 3-propilacetamido indol **11a**

A pesar de que existen antecedentes que indican que la reducción del grupo carbonilo de oxindoles sustituidos en C3 ocurre con  $\text{LiAlH}_4$  para dar indoles,<sup>34</sup> en el presente caso la reducción selectiva del carbonilo en **8a** se llevó a cabo usando borano de dimetilsulfóxido (BMS)<sup>35</sup> para dar el correspondiente 3-propionitrilindol **10a** en un rendimiento del 50%. La subsecuente reducción-acetilación del grupo ciano de **10a** en presencia de Ni-Raney en  $\text{Ac}_2\text{O}$  condujo al 3-propilacetamidoindol **11a** esperado en 54% de rendimiento (Esquema 7).

Cabe señalar que la presencia del grupo metoxilo en C5 en el oxindol **8b** lo haría ser un precursor potencial de un análogo de la melatonina en el que la cadena lateral en C3 se encuentra elongada en un metileno.



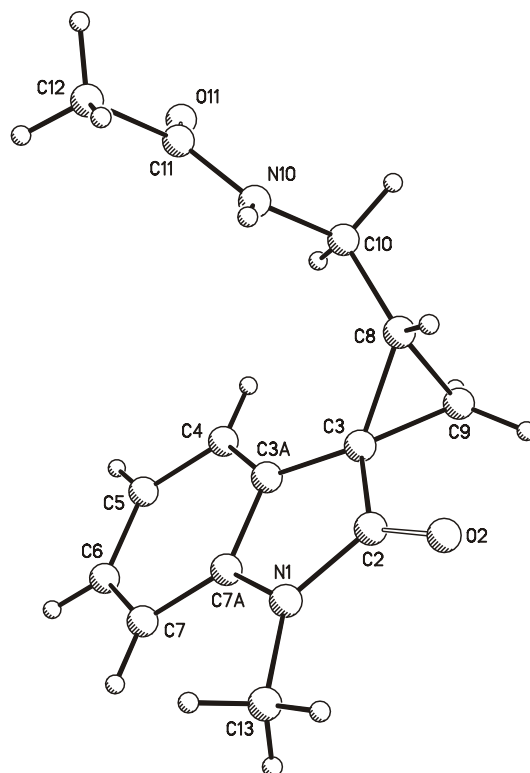
**Esquema 7.** Síntesis del 3-propilacetamido indol **11a**.

#### 4.1.5 Preparación de 3-propilacetamido oxindoles **9a-c** y de espirociclopropiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano *anti-5a-c*

La hidrogenación de *anti-2a* en presencia de Ni-Raney a 3 atm (44 psi) usando Ac<sub>2</sub>O como disolvente, dio lugar a la formación prioritaria del 3-propilacetamidooxindol **9a**, que resulta de la apertura regioselectiva del anillo de ciclopropano, concomitante con la reducción-acetilación del grupo nitrilo. De esta reacción, junto con **9a**, se aisló además, aunque en menor proporción, el correspondiente espirociclopropiloxindol sustituido por un grupo amidometano *anti-5a*. Sin embargo, es importante señalar que la separación de esta mezcla en forma de miel, por métodos cromatográficos convencionales resultó infructuosa. (Tabla 4, 1). Es relevante mencionar que, de acuerdo al análisis por CG/EM y RMN de <sup>1</sup>H del crudo de reacción, la conversión del espiro[ciclopropil-1-3'-oxindol] *anti-2a* fue completa y no se detectó la presencia de el espirociclopropilamidometano epimérico *syn-5a*.

La relación de los productos **9a** y *anti-5a* fue de 3:1, según se determinó por análisis de CG/EM y RMN de <sup>1</sup>H de la mezcla obtenida después de ser purificada por CF. La asignación estructural de **9a** se confirmó por comparación de sus datos espectroscópicos con los obtenidos para el mismo compuesto en la sección 4.1.3. Cabe señalar, que después de que la mezcla de **9a** y *anti-5a* permaneció varios

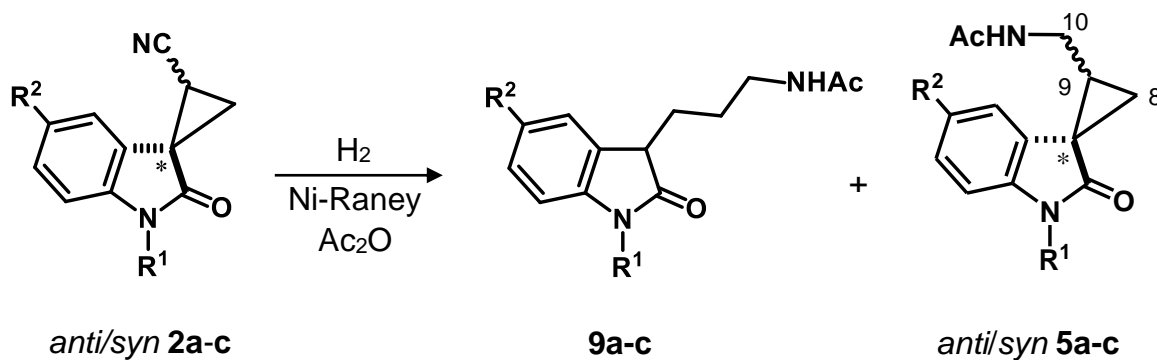
meses en la mesa de laboratorio, se observó el depósito de un sólido cubierto por una miel, la que fue separada mecánicamente del sólido. El sólido se lavó cuidadosamente con acetona y se recristalizó de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexano para dar cristales incoloros de p.f. 188-189 °C. El análisis por RMN <sup>1</sup>H indicó que se trataba del espirociclopropiloxindol *anti*-**5a** y la estructura se confirmó por difracción de rayos-X de un monocristal (Figura 6)



**Figura 6.** Estructura molecular del espiro[ciclopropil-1,3-oxindol] sustituido por un grupo acetamidometano *anti*-**5a** obtenido por difracción de rayos-X.

Se investigó también la influencia del grupo metoxilo en el anillo aromático y la sustitución por el grupo bencilo en la posición N1 de los espirociclopropiloxindoles *anti*-**2b** y *anti*-**2c** (Tabla 4, 3 y 5). Como se puede observar en los isómeros *anti*-**2b** y *anti*-**2c** los sustituyentes metoxilo o bencilo no mostraron mucha diferencia en cuanto a la reactividad, ya que se obtuvieron mezclas de propil-acetamido/espirociclopropilacetamidometano **9b,c/anti-5b,c** en relación 3:1 y en rendimientos globales del 87% y 85% respectivamente.

**Tabla 4** Hidrogenólisis de los espiro[ciclopropil-1,3-oxindoles] *anti/syn* **2a-c** con Ni-Raney en Ac<sub>2</sub>O<sup>a,b</sup>



	Espirooxindol <b>2</b>	Relación <b>9:5<sup>c</sup></b>	Rendimiento global (%)
1	<i>anti-a</i>	3:1	75
2	<i>syn-a</i>	6:1	78
3	<i>anti-b</i>	3:1	87
4	<i>syn-b</i>	6:1	84
5	<i>anti-c</i>	3:1	85
6	<i>syn-c</i>	6:1	91

<sup>a</sup>Para R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> ver Figura 2.

<sup>b</sup>30 mg/mL de Ac<sub>2</sub>O, 200% en peso del catalizador, 3 atm, 5 h, t.a.

<sup>c</sup>Determinado por CG/EM y/o RMN de <sup>1</sup>H de la mezcla en el crudo de reacción.

#### 4.1.6 Preparación de espirociclopropiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano *syn-5a-c*

Para complementar los resultados antes descritos, se decidió examinar la reactividad del espirociclopropiloxindol *syn-2a* en las mismas condiciones de hidrogenación usadas para el isómero *anti-2a*. El análisis de la mezcla del crudo de reacción por CG/EM y RMN de  $^1\text{H}$  resultante de la hidrogenación del isómero *syn-2a* mostró la presencia de 3-propilacetamidooxindol **9a** junto con la espirociclopropil amidometano *syn-5a* en una relación 6:1. Después de la purificación de la mezcla por cromatografía flash (CF), los rendimientos de **4a** y *syn-5a* fueron del 67% y 11% respectivamente. Con estos resultados se determinó que el isómero *syn-2a* presenta una mayor quimio- y regioselectividad con respecto a aquella observada para el isómero *anti-2a* (Tabla 4, 2).

Cuando *syn-2b* y *syn-2c* se sometieron por separado a hidrogenación en las mismas condiciones de reacción, se obtuvieron mezclas de **9b**/*syn-5b* y **9c**/*syn-5c* en proporciones de 6:1 respectivamente para ambos casos; las cuales fueron separadas por medio de cromatografía flash obteniéndose rendimientos del 72% para **9b** y 12% para *syn-5b* y 78% para **9c** y 13% para *syn-5c*. Estos resultados muestran que efectivamente existe una mayor quimio- y regioselectividad en los isómeros *syn* con respecto a los isómeros *anti* en esta serie de compuestos (4, 6, Tabla 4).

Con base en los resultados de la hidrogenación y con los estudios de modelado molecular de *anti/syn-2a-2c* descritos arriba, se puede asumir que el aumento de la tensión en el anillo de ciclopropano de los isómeros *syn* es el factor responsable de la disminución en la estabilidad y en el aumento de la quimioselectividad observada. Por otra parte, el hecho de haberse formado el 3-propilacetamido oxindol **9a** en mayor rendimiento que el espirociclopropilamidometano *syn-5a*, demuestra claramente que bajo estas condiciones de reacción la apertura del anillo ocurre mucho más rápido que la reducción del grupo ciano. Para corroborar



este hecho, el espirociclopropilamidometano *syn-5a* se hidrogenó bajo las mismas condiciones que se describieron anteriormente para **9a**, recuperándose el espirociclopropilamidometano *syn-5a*. Estos resultados demuestran que el alargamiento y por lo tanto el debilitamiento del enlace C3-C9 del anillo de ciclopropano no sólo depende fuertemente del carácter electrotractor del grupo ciano, sino también de la estereoquímica de sus centros estereogénicos.

La asignación de la estereoquímica relativa de los diastereoisómeros *anti/syn-5a-c* se realizó por medio de sus espectros NOESY, con particular atención en la determinación de la proximidad espacial entre los hidrógenos H4, H8 y H9 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ), constantes de acoplamiento  $^2J(\text{H,H})$  y  $^3J(\text{H,H})$  Hz, y correlaciones NOESY de espirociclopropiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano *syn-5a-c* en  $\text{CDCl}_3$

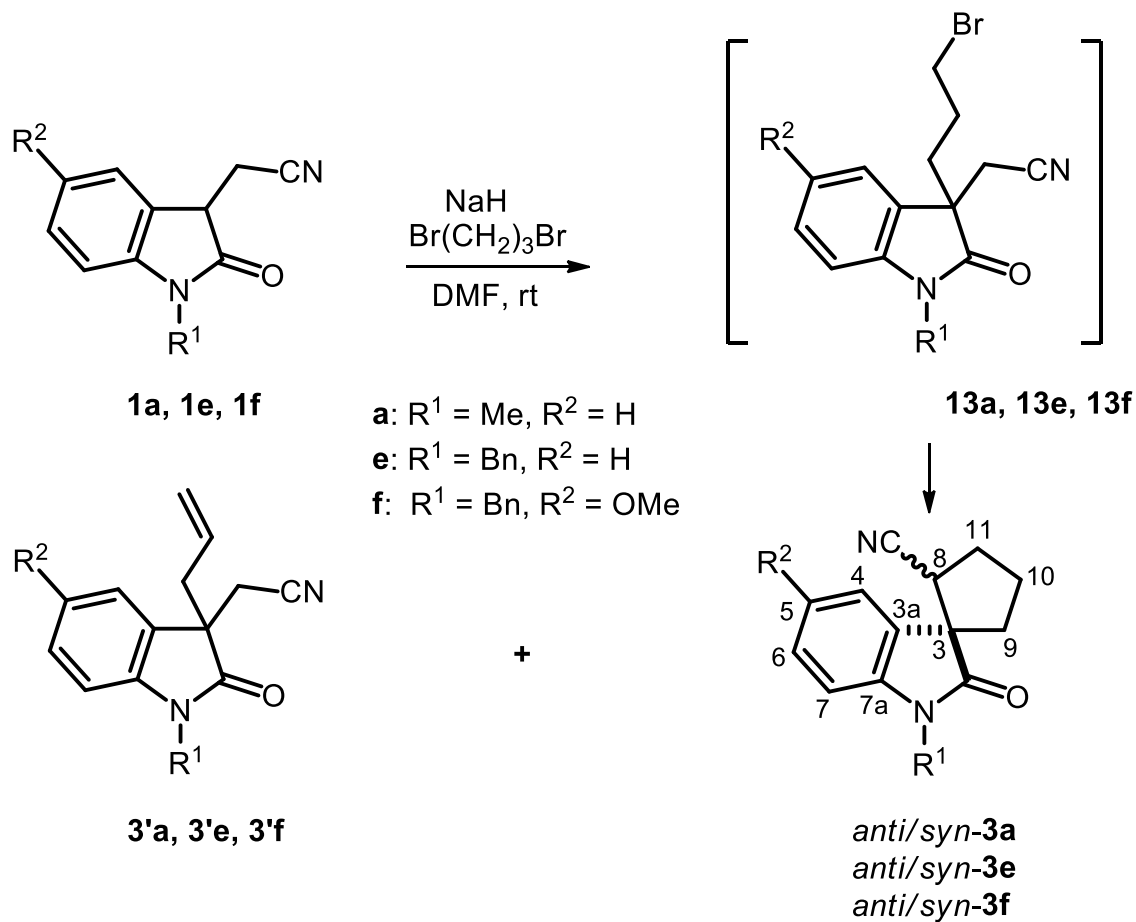
<i>syn-5</i>	$\delta\text{H4}$	$^2J_{\delta a,8s}^a$	$^3J_{\delta a,9}$	$^3J_{\delta s,9}$	Correlaciones NOESY H4
<b>a</b>	6.82	4.7	8.2	8.8	H8a ( $\delta$ 1.72), H9 ( $\delta$ 2.34)
<b>b</b>	6.41	4.7	7.9	8.9	H8a ( $\delta$ 1.69), H9 ( $\delta$ 2.31)
<b>c</b>	6.80	4.7	8.2	8.2	H8a ( $\delta$ 1.78), H9 ( $\delta$ 2.37)

<sup>a</sup>Los hidrógenos diastereoméricos del anillo de ciclopropano fueron designados como *anti* (*a*) o *syn* (*s*) con respecto al grupo carbonilo en C2.

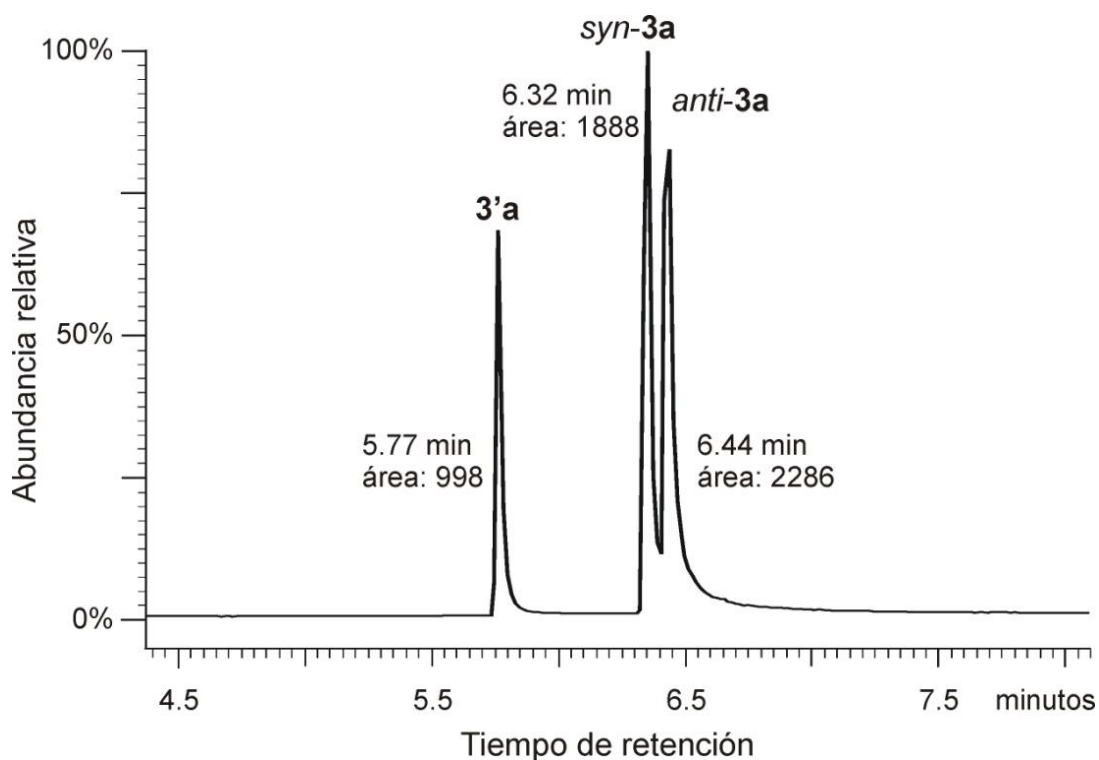
## 4.2 Síntesis de espirociclopentiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano *anti/syn*-6a y *anti/syn*-6f

### 4.2.1 Preparación y análisis estructural de espirociclopentiloxindoles sustituidos por un grupo nitrilo *anti/syn*-3e y *anti/syn*-3f

La espirociclopentanación de **1e** y **1f** se realizó por tratamiento con dibromopropano durante 5 h a temperatura ambiente (Esquema 8), siguiendo las condiciones descritas para **1a**,<sup>25</sup> cuyos resultados se indican en la Tabla 6.



**Esquema 8.** Productos obtenidos por espirociclización de **1a** y **1f**.

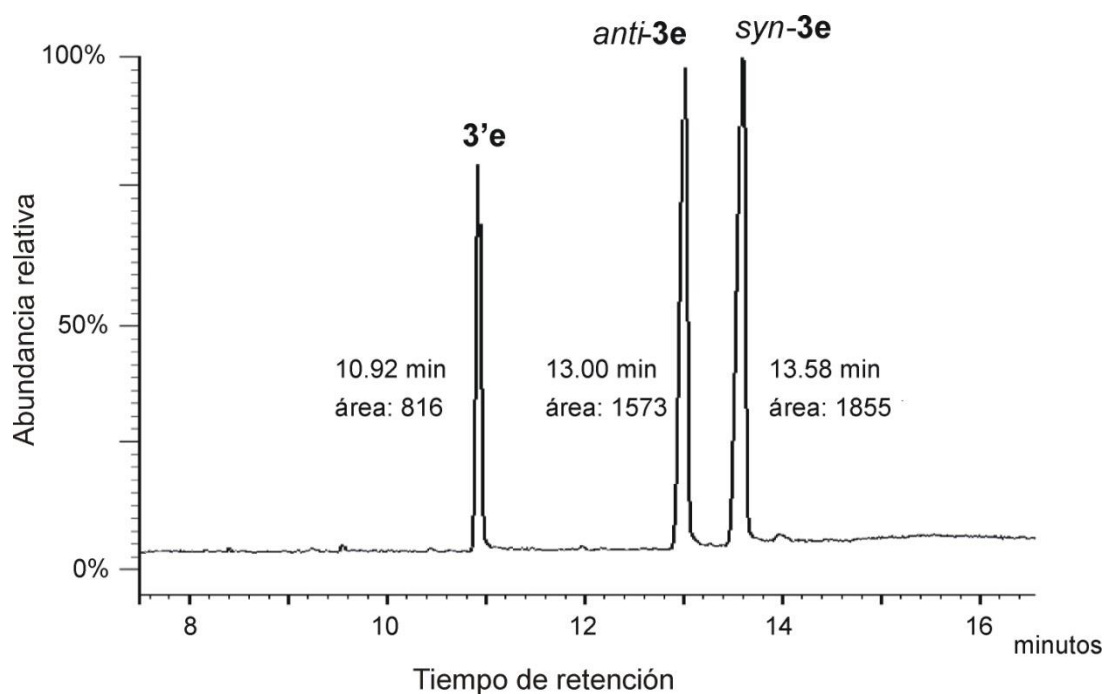


**Figura 7.** Cromatograma de la mezcla *anti-3a*, *syn-3a* y *3'a*

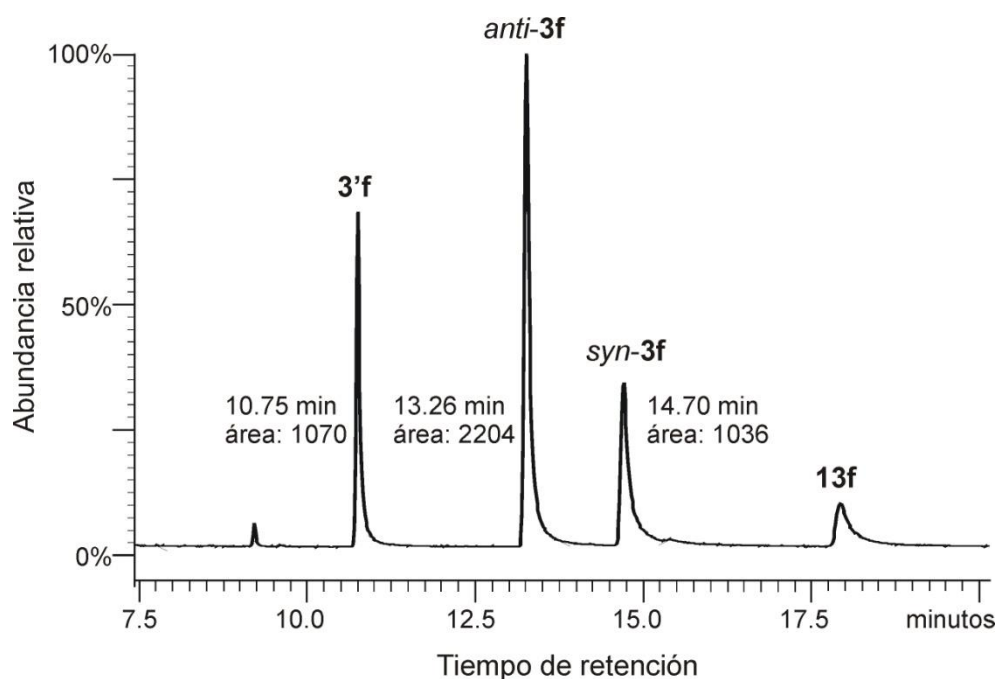
Al igual que en el caso de la alquilación de **1a** con dibromopropano (Figura 7), el análisis por CG/EM de la mezcla de reacción resultante de la reacción de **1e** y **1f** con dibromopropano indicó la presencia de tres componentes mayoritarios, Figuras 8 y 9. La identificación y determinación cuantitativa de cada componente se llevó al cabo tomando en consideración el tiempo de retención en los cromatogramas (Tabla 6), el área bajo la curva de los picos, el análisis de sus espectros de masa obtenidos en condiciones de impacto electrónico y por análisis de RMN de  $^1\text{H}$  de las mezclas. Como se observa en los cromatogramas de las Figuras 8 y 9, en cada caso se obtuvo una mezcla diastereomérica *anti/syn* **3e** ó **3f** junto con un 3-propenoxindol **3'e** ó **3'f**. Los 3-propenoxindoles **3'e** y **3'f** se asignaron a los picos con tiempos de retención de 10.92 y 10.75 min respectivamente en los cromatogramas de CG/EM. Los rendimientos se dan en la Tabla 7.

**Tabla 6.** Datos de CG/EM de espirociclopentiloxindoles *anti-3e*, *syn-3e*, *anti-3f*, *syn-3f* y 2-propenoxindoles **3'e** y **3'f**

	<b>3e</b>		<b>3'e</b>	<b>3f</b>		<b>3'f</b>
	<i>anti</i>	<i>syn</i>	-	<i>anti</i>	<i>syn</i>	-
Tiempo de retención (min)	13.00	13.58	10.92	13.26	14.70	10.75
M <sup>+</sup> (m/z)	302	302	302	332	332	332
Intensidad relativa M <sup>+</sup>	100	100	97	100	100	84
Pico base (m/z)	302	302	262	332	332	292



**Figura 8.** Cromatograma de la mezcla *anti-3e*, *syn-3e* y **3'e**



**Figura 9.** Cromatograma de la mezcla *anti-3f*, *syn-3f*, *3'f* y del intermediario de síntesis **13f** (no integrado).

**Tabla 7.** Productos obtenidos por alquilación de **1a**, **1e** y **1f** con dibromopropano<sup>a</sup>

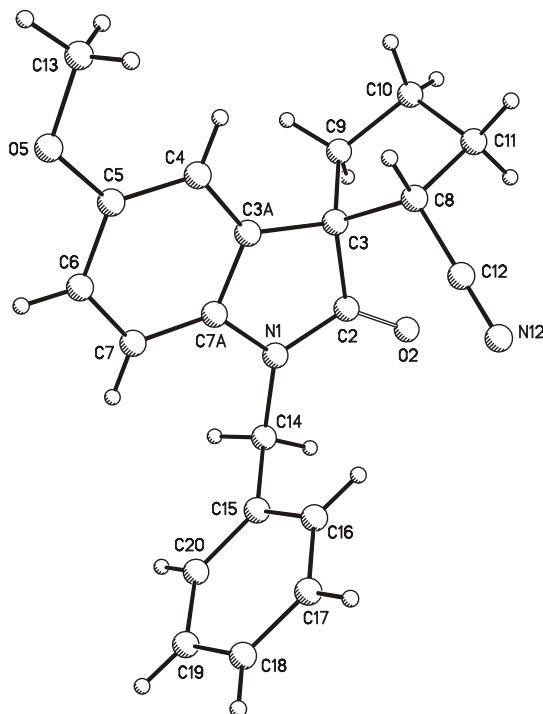
	Oxindol <b>1</b>	Relación <sup>a</sup> <i>anti-3:syn-3:3'</i>	Rendimiento <sup>b</sup> <i>anti/syn-3</i> (%)	Rendimiento <sup>b</sup> <b>3'</b> (%)
1	<b>a</b> <sup>c</sup>	3:2:1	53	10
2	<b>e</b>	6:7:3	56	13
3	<b>f</b>	2:1:1	53	18

<sup>a</sup>Determinada por CG/EM y/o RMN de <sup>1</sup>H de la mezcla en el crudo de reacción.

<sup>b</sup>Rendimiento en mezcla.

<sup>c</sup>Referencia 24.

Cabe señalar que la separación de los componentes de la mezcla *anti-3e*, *syn-3e* y *3'e* por métodos cromatográficos convencionales resultó infructuosa. Sin embargo, de la mezcla conformada por *anti-3f*, *syn-3f* y 3-propenoxindol *3'f* se separó por cristalización el isómero *syn-3f* como cristales incoloros de p.f. 130-131 °C (acetona/hexano). La recrystalización del espirociclopentil oxindol *syn-3f*, generó cristales adecuados para análisis por difracción de rayos-X, Figura 10. De la CF de las aguas madres fue posible obtener fracciones puras iniciales de *anti-3f* y finales de *3'f*.



**Figura 10.** Estructura molecular del espiro[ciclopentil-1,3-oxindol] sustituido por un grupo nitrilo *syn-3f* obtenido por difracción de rayos-X.

La asignación de la estereoquímica relativa del par diastérico *anti/syn-3f* se realizó por el estudio detallado de sus espectros NOESY, con particular atención en la determinación de la proximidad espacial del hidrógeno H4 con los hidrógenos H9a, H10a y H11a en el isómero *anti* y de H4 con H8a y H9a en el isómero *syn* (Tabla 8).

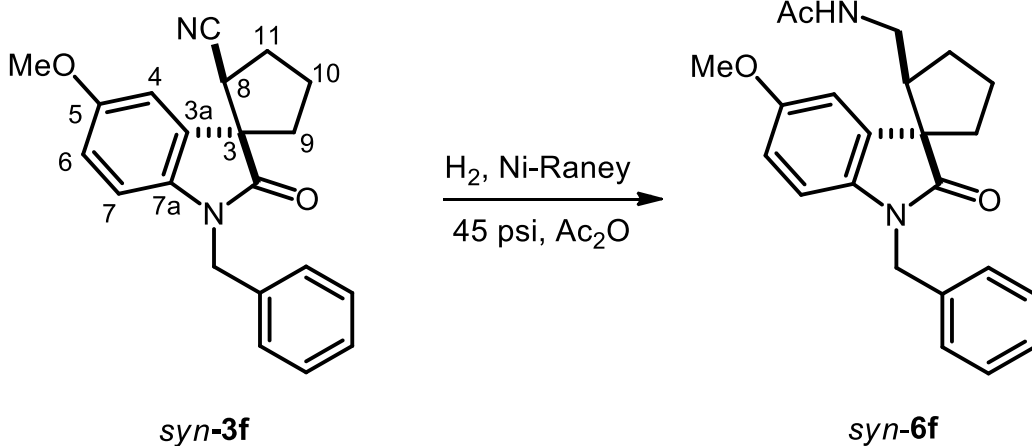
**Tabla 8.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ), constantes de acoplamiento  $^3J(\text{H}_8, \text{H}_{11})$  en Hertz, y correlaciones NOESY de los diasterómeros *anti/syn-3f* en  $\text{CDCl}_3$ .<sup>a</sup>

<b>3</b>	$\delta\text{H}_4$	$\delta\text{H}_8$	$^3J_{8s,11a}$	$^3J_{8s,11s}$	Correlaciones NOESY H4
<i>anti-f</i>	6.95	3.39	9.4	8.2	H9a ( $\delta$ 2.03), H10a ( $\delta$ 2.18), 11a ( $\delta$ 2.31)
			$^3J_{8a,11a}$	$^3J_{8a,11s}$	
<i>syn-f</i>	6.78	3.08	7.9	11.3	H8a ( $\delta$ 3.08), H9a ( $\delta$ 2.06)

<sup>a</sup>Los hidrógenos diasteroméricos del ciclopentano fueron designados como *anti* (a) o *syn* (s) con respecto al grupo carbonilo en C2.

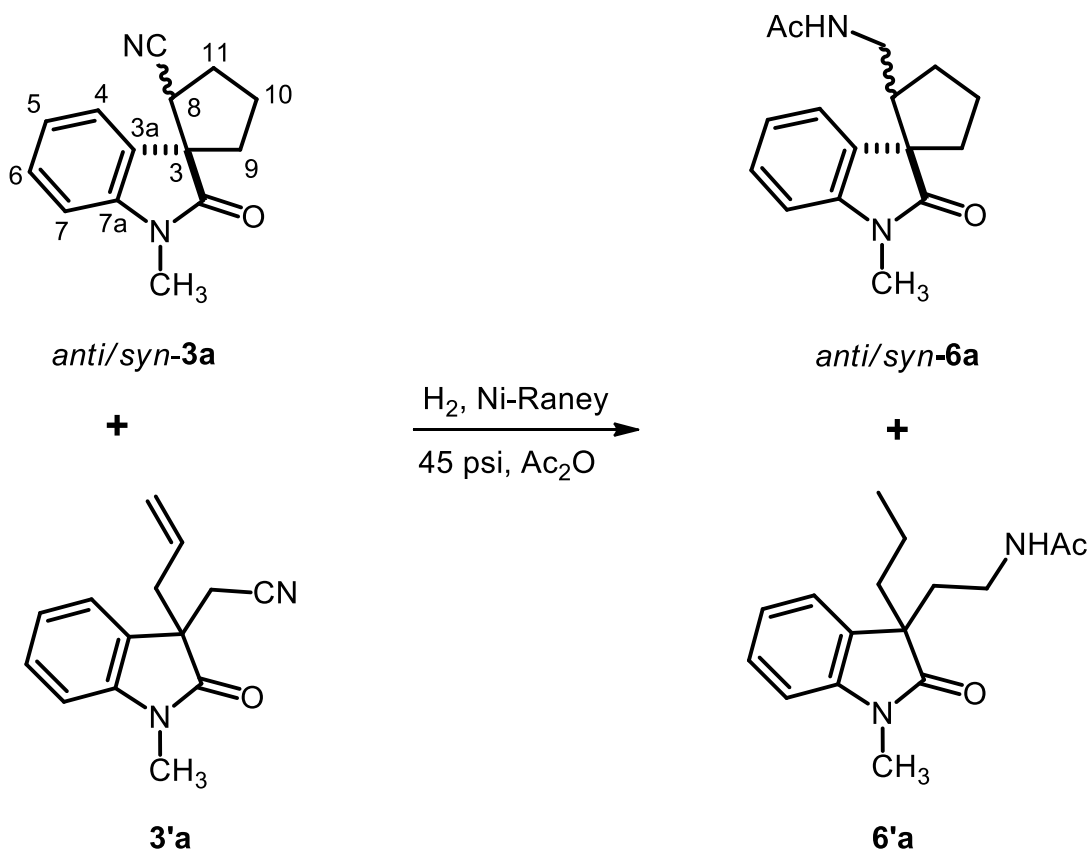
#### 4.2.2 Preparación y análisis estructural de los espirociclopentiloxindoles sustituidos por un grupo amidometano *anti-6a*, *syn-6a*, *anti-6f* y *syn-6f*

La hidrogenación de *anti-3f* (aislado puro por CF, sección 4.2.1) en presencia de Ni-Raney (200% en peso) a 3 atm (44 psi) usando  $\text{Ac}_2\text{O}$  como disolvente (30 mg de sustrato/mL de  $\text{Ac}_2\text{O}$ ), durante 5 h a temperatura ambiente, dio lugar a la formación del espirociclopentiloxindol sustituido por un grupo amidometano *anti-6f* en rendimiento del 98%, sin detectar productos resultantes de la apertura del anillo de ciclopentano, tal como lo demostró el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del crudo de reacción. De igual manera, la hidrogenación de *syn-3f* (aislado puro por cristalización) condujo al diasterómero *syn-6f* en un rendimiento del 99% (Esquema 9).



**Esquema 9.** Síntesis del espirociclopentiloxindol *syn-6f*

La mezcla compuesta por *anti-3a*, *syn-3a* y **3'a**, fue hidrogenada y los productos de reacción *anti-6a*, *syn-6a* y **6'a** (Esquema 10) fueron analizados por CG/MS (Figura 11).



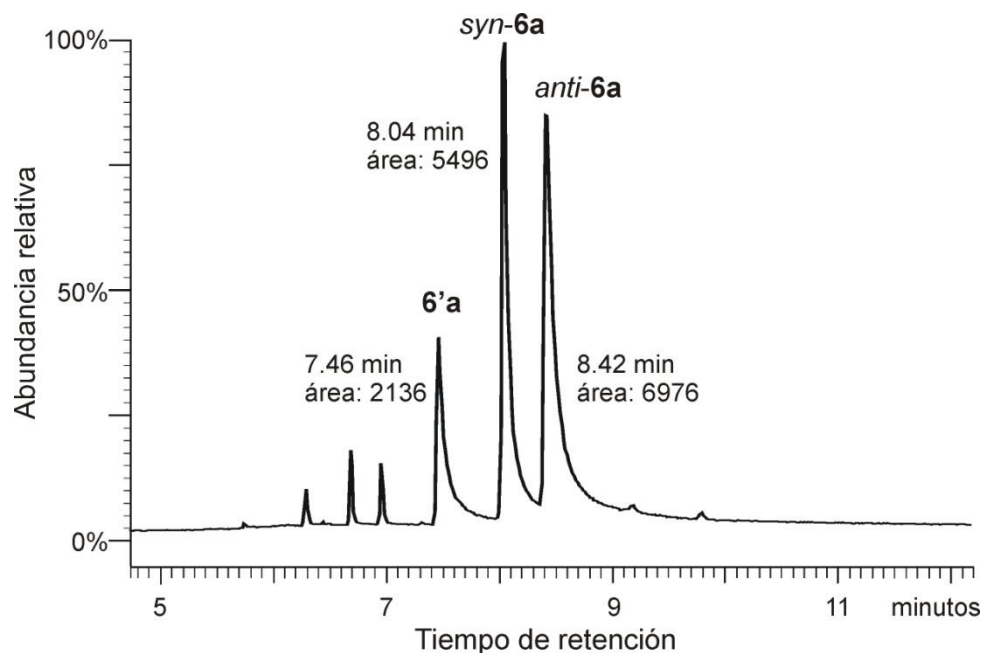
**Esquema 10.** Productos obtenidos por hidrogenación catalítica de la mezcla *anti/syn-3a* y **3'a**.



La identificación y determinación cuantitativa del par diastereomérico *anti-6a/syn-6a* se llevó a cabo tomando en consideración el tiempo de retención en el cromatograma CG/EM (Tabla 9), el área bajo la curva de los picos, el análisis de sus espectros de masa obtenidos en condiciones de impacto electrónico y por análisis de RMN de  $^1\text{H}$  de la mezcla. Los rendimientos se dan en la Tabla 10

**Tabla 9.** Datos de CG/EM de *anti-6a*, *syn-6a* y **6'a**

	<i>anti-6a</i>	<i>syn-6a</i>	<b>6'a</b>
Tiempo de retención (min)	8.41	8.04	7.46
$M^+$ ( $m/z$ )	272	272	274
Intensidad relativa $M^+$	34	76	1
Pico base ( $m/z$ )	199	161	161



**Figura 11.** Cromatograma de la mezcla *anti-6a*, *syn-6a* y **6'a**

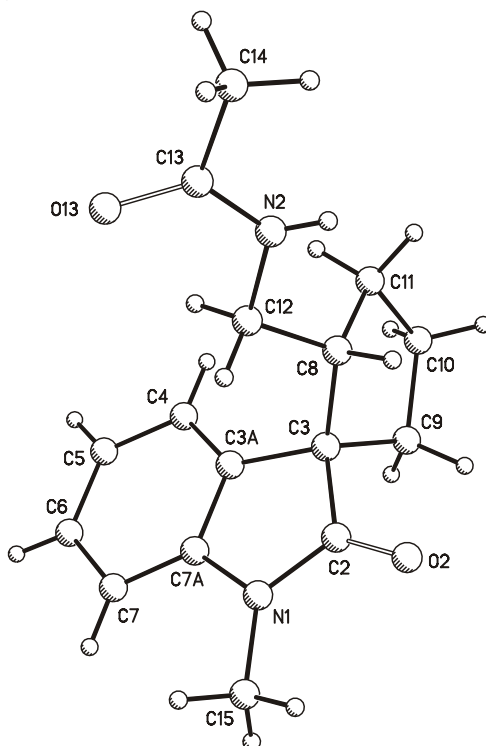
**Tabla 10.** Productos obtenidos por hidrogenación catalítica de *anti/syn-3a* y *3'a*

Relación <sup>a</sup>	Rendimiento <sup>b</sup>	Rendimiento <sup>b</sup>
<i>anti-6a: syn-6a: 6'a</i>	<i>anti/syn-6a</i> (%)	<b>6'a</b> (%)
10:8:3	44/36	12

<sup>a</sup>Determinada por CG/EM y/o RMN <sup>1</sup>H de la mezcla en el crudo de reacción.

<sup>b</sup>Rendimiento en mezcla.

De la mezcla *anti-6a/syn-6a* fue posible aislar por cristalización el diastéromero *anti-6a* y de las aguas madres se purificó por CF (AcOEt) el diastéromero *syn-6a* obteniéndose una miel ámbar. La recrystalización de acetona/hexano de *anti-6a* generó cristales incoloros con p.f. 176-177 °C, adecuados para análisis por difracción de rayos-X (Figura 12).



**Figura 12.** Estructura molecular del espiro[ciclopentil-1,3-oxindol] sustituido por un grupo acetamidometano *anti-6a* obtenido por difracción de rayos-X.

La asignación de la estereoquímica relativa de los pares diasterómicos *anti/syn-6a* y *anti/syn-6f* se realizó por el estudio detallado de sus espectros NOESY, con particular atención en la determinación de la proximidad espacial del hidrógeno H4 con los hidrógenos H9a y H11a en los isómeros *anti* y de H4 con H8a y H9a en los isómeros *syn* (Tabla 11).

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ) y correlaciones NOESY de los diasterómeros *anti/syn-6a* y *anti/syn-6f* en  $\text{CDCl}_3$ .<sup>a</sup>

<b>6</b>	$\delta\text{H4}$	$\delta\text{H8}$	Correlaciones NOESY H4
<i>anti-a</i>	7.20	2.66	H9a ( $\delta$ 1.83), 11a ( $\delta$ 1.76)
<i>syn-a</i>	7.19	2.60	H8a ( $\delta$ 2.60), H9a ( $\delta$ 1.97)
<i>anti-f</i>	6.82	2.71	H9a ( $\delta$ 2.33), 10a ( $\delta$ 2.07), 11a ( $\delta$ 1.76)
<i>syn-f</i>	6.79	2.63	H8a ( $\delta$ 2.64), H9a ( $\delta$ 1.98)

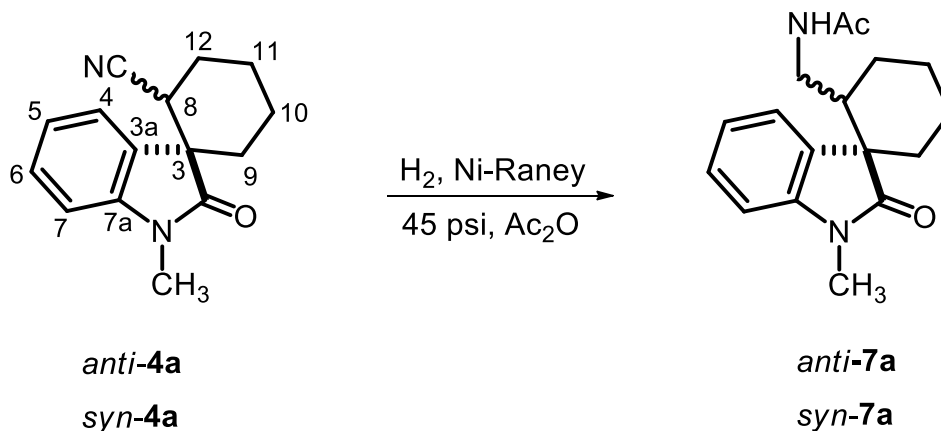
<sup>a</sup>Los hidrógenos diasteroméricos del anillo de ciclopentano fueron designados como *anti* (a) o *syn* (s) con respecto al grupo carbonilo en C2.

### 4.3 Síntesis de espirociclohexiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano *anti-7a* y *syn-7a*

#### 4.3.1 Preparación y análisis estructural de los espirociclohexiloxindoles sustituidos por un grupo acetamidometano *anti-7a* y *syn-7a*

La espirociclohexanación de **1a** para dar el par diastereomérico *anti-4a* y *syn-4a* es conocida y se realizó, siguiendo las condiciones descritas,<sup>24</sup> por tratamiento con dibromobutano durante 10 h a temperatura ambiente. Los diastereómeros *anti-4a* y *syn-4a* fueron obtenidos puros como sólidos cristalinos y sus puntos de fusión y datos espectroscópicos coinciden con los descritos.<sup>24</sup>

Al igual que en el caso de los nitrilespirociclopentiloxindoles **3**, la hidrogenación de *anti-4a* y *syn-4a* en presencia de Ni-Raney a 3 atm usando Ac<sub>2</sub>O como disolvente, dio lugar únicamente a la formación de los espirociclohexiloxindoles sustituidos por un grupo amidometano *anti-7a* y *syn-7a*, resultantes de la reducción-acetilación del grupo nitrilo en rendimientos del 86 y 82% (Esquema 11).



Esquema 11. Síntesis del par diastereomérico *anti-7a* y *syn-7a*.

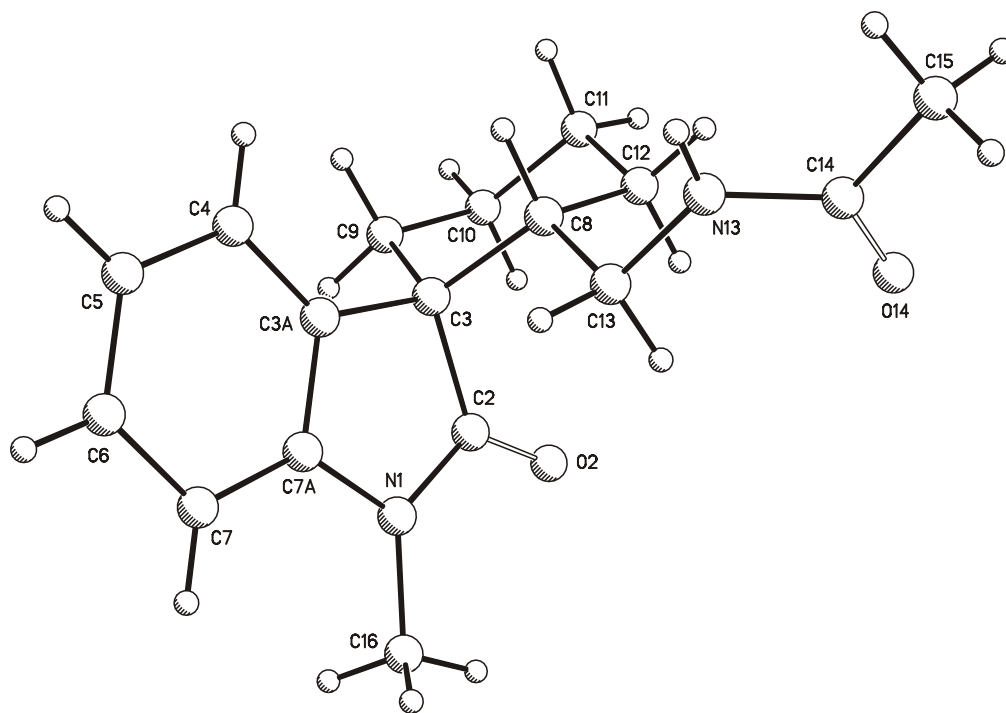
La asignación de la estereoquímica relativa de los diastereoisómeros *anti-7a* y *syn-7a* se realizó por análisis de sus espectros NOESY, con base en la determinación de la proximidad espacial del hidrógeno H4 con H10a y H12a en *anti-7a* y de H4 con H8a y H9a en *syn-7a* (Tabla 12).

**Tabla 12.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ) y correlaciones NOESY de *anti-7a* y *syn-7a* en  $\text{CDCl}_3$ .<sup>a</sup>

<b>7a</b>	$\delta\text{H4}$	$\delta\text{H8}$	Correlaciones NOESY H4
<i>anti</i>	7.54	2.18	H10a ( $\delta$ 1.74), H12a ( $\delta$ 1.62)
<i>syn</i>	7.17	2.10	H8a ( $\delta$ 2.10), H9a ( $\delta$ 1.72)

<sup>a</sup>Los protones diastereoméricos del anillo de ciclohexano fueron designados como *anti* (a) o *syn* (s) con respecto al grupo carbonilo en C2.

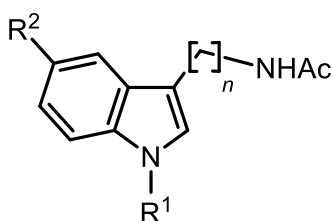
Los espirociclohexiloxindoles *anti-7a* y *syn-7a* se aislaron puros como sólidos. La cristalización de acetona/hexano de *syn-7a* generó cristales incoloros de p.f. 154-155 °C, adecuados para análisis por difracción de rayos-X, Figura 13.



**Figura 13.** Estructura molecular del espiro[ciclohexil-1,3-oxindol] sustituido por un grupo acetamidometano *syn-7a* obtenido por difracción de rayos-X.

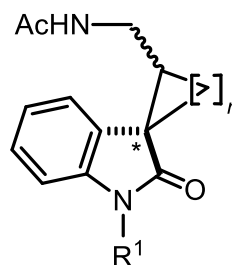
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE ENSAYOS DPPH Y BIOLÓGICOS

En la búsqueda de nuevos agentes antioxidantes, se realizó un estudio de relación estructura-actividad antioxidante (Structure-Activity-Relationship, SAR de sus siglas en inglés) de tres pares diastereoméricos con esqueleto base *N*-metilespirooxindol *anti/syn* **5a–7a**, análogos sintéticos de la melatonina (MLT), caracterizados por la limitación conformacional de la cadena *N*-acetil-2-aminoetil. El estudio incluyó además la *N*-acetil homotriptamina **11a**.



MLT:  $R^1 = H$ ,  $R^2 = OMe$ ,  $n = 2$

**11a**:  $R^1 = Me$ ,  $R^2 = H$ ,  $n = 3$



*anti/syn* **5a, 6a, 7a**

### 5.1 Actividad antioxidante *in vitro*

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es contrarrestado o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra. Hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en el tiempo de evaluación, en la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y en las interacciones de la muestra con el medio de reacción.

Muchos de los métodos de medida de la actividad antioxidante no emplean especies radicales de significado biológico, sino radicales que son oxidantes iniciadores ajenos al organismo; por ejemplo, el 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH de sus siglas en inglés) o el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid, ABTS de sus siglas en inglés). El empleo de radicales peróxido o hidroxilo en ensayos como la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity assay, ORAC de sus siglas en inglés), el potencial total de atrapamiento de radicales peróxido (total peroxy radical-trapping antioxidant parameter, TRAP de sus siglas en inglés), la capacidad total de atrapamiento de oxiradicales (total oxyradical scavenging capacity, TOSC de sus siglas en inglés) y el diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA de sus siglas en inglés) les añade un mayor significado biológico, ya que estas ERO son las más importantes a nivel fisiológico.<sup>36</sup> Cabe señalar que hay compuestos antioxidantes que no reaccionan con determinadas especies oxidantes y sí con otras, pudiéndose obtener así valores dispares entre los distintos métodos.<sup>37</sup>

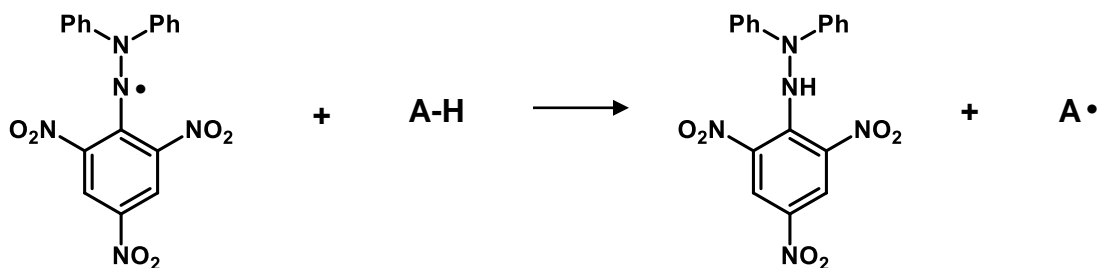
Con el objetivo de investigar la actividad captadora de radicales libres (ACRL) de tres pares diastereoméricos con esqueleto base *N*-metilespirooxindol *anti/syn* **5a–7a** y de la *N*-acetil homotriptamina **11a** se realizaron dos ensayos el DPPH y el DCFH-DA.



### 5.1.1 Actividad antioxidante por el método DPPH

Una de las principales aplicaciones del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) es monitorear reacciones que involucran radicales libres. El ensayo DPPH es el método más simple y una primera aproximación para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, un extracto u otras fuentes biológicas. Sin embargo, el método posee ciertas deficiencias, tales como la omisión para indicar la actividad antioxidante de compuestos que actúan como tales, siendo un ejemplo la MLT. Otra limitante es la interferencia con pigmentos de productos naturales.<sup>38</sup>

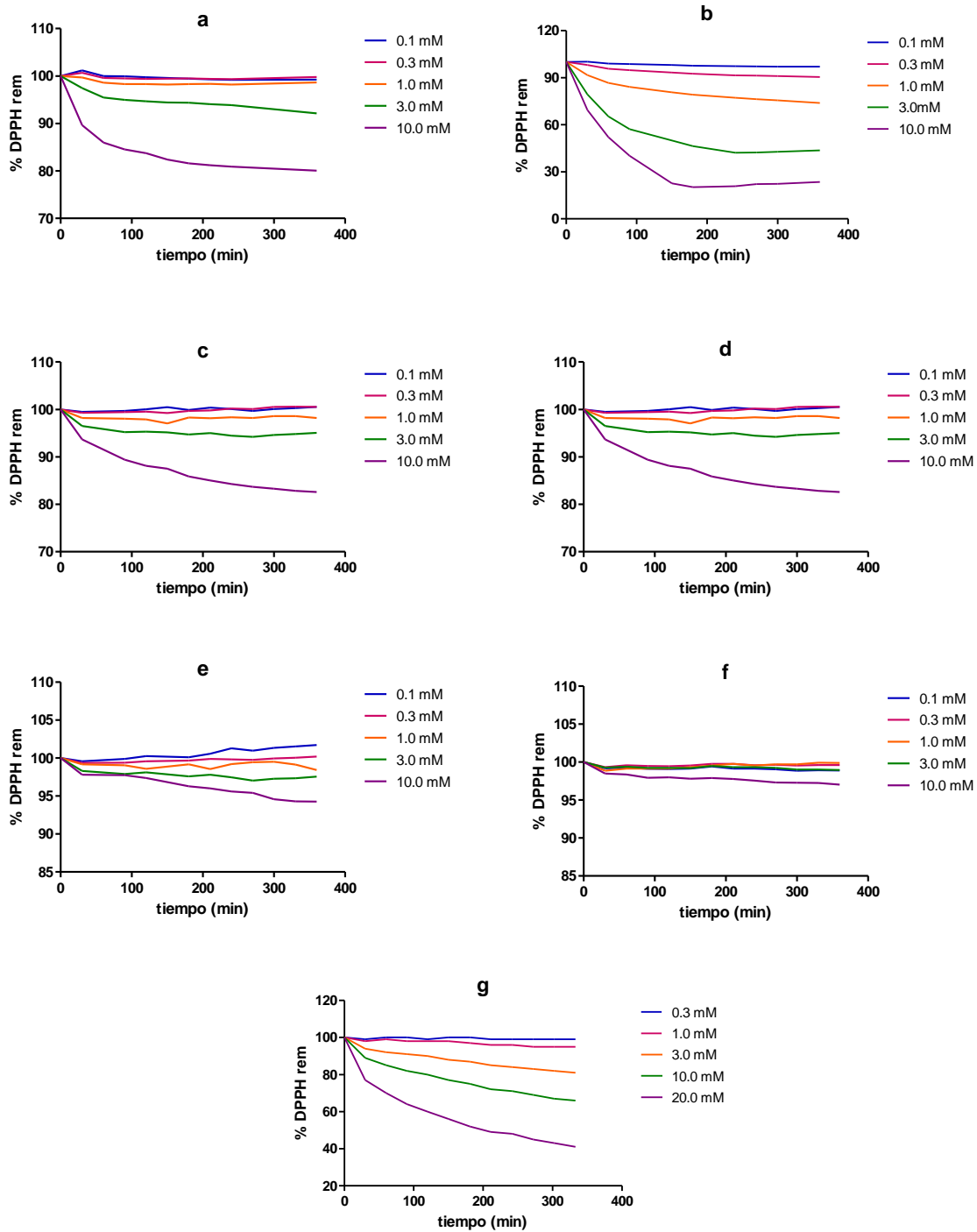
El DPPH se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización de un electrón sobre toda la molécula, así que la molécula no dimeriza, tal como ocurre con otros radicales libres. La deslocalización da lugar al desarrollo de un color violeta que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante. El antioxidante al donar un átomo de hidrógeno se oxida y da lugar a la forma reducida del DPPH (Esquema 12).



**Esquema 12.** Reacción del radical DPPH con un antioxidante (A-H).

#### 5.1.1.1. Determinación de la actividad captadora de radicales libres (ACRL) de los compuestos *anti* y *syn* **5a–7a**, **11a**, MLT y trólox sobre el DPPH

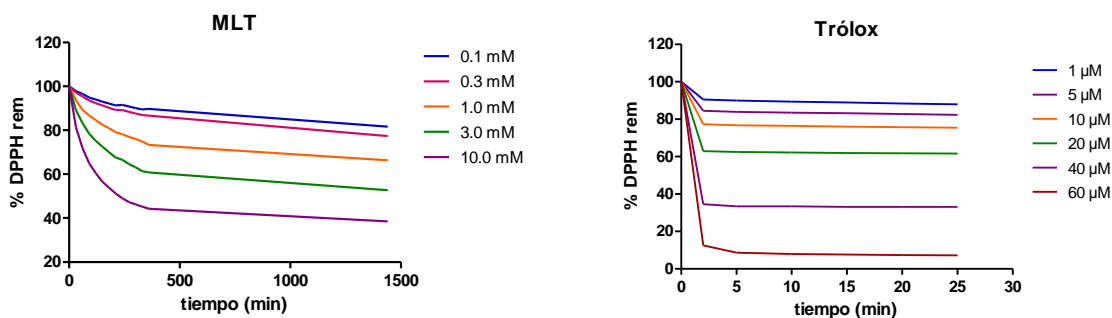
El análisis de la actividad captora de radicales libres (ACRL) de los compuestos **5a–7a**, **11a** y de la MLT, dada por la evolución de su cinética de reacción (Figuras 14 y 15), se determinó al término del tiempo de exposición de los compuestos con el radical libre estable DPPH esto es, hasta que el remanente DPPH alcanzó el equilibrio. Cada uno de los compuestos fue evaluado por triplicado, en soluciones etanólicas a diferentes concentraciones (0.01–20.0 mM) y a intervalos de 30 min hasta 360 min y una última medición a los 1440 min (24 h), en presencia del radical libre DPPH (0.1 mM), empleando como control una solución etanólica, que representa el 100% de DPPH, a 25 °C. El trólox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es un antioxidante sintético derivado de la vitamina E, que se ha empleado, al igual que en este estudio, como estándar (control positivo) en estudios bioquímicos.<sup>39</sup>



**Figura 14.** Cinética de reacción de los compuestos (a) *anti-5a*, (b) *syn-5b*, (c) *anti-6a*, (d) *syn-6a*, (e) *anti-7a*, (f) *syn-7a*, y (g) **11a** a diferentes concentraciones.

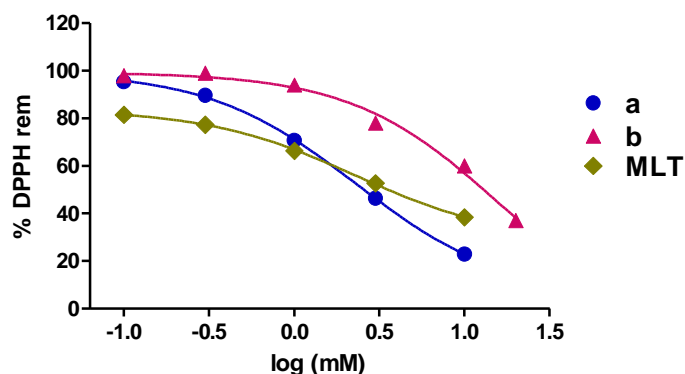
Como se observa en la Figura 14, las cinéticas de reacción de los compuestos analizados fueron lentas alcanzado el equilibrio al cabo de varias horas, a diferencia del trólox, cuya oxidación ocurrió en pocos minutos (Figura 15). Los compuestos *anti-5a*, *anti-6a* y *syn-6b* mostraron a la concentración 10.0 mM una ACRL incipiente, con aproximadamente un 80% de DPPH remanente al equilibrio (alrededor de 5 h), en tanto que los compuestos *anti-7a* y *syn-7a* carecen de ACRL, ya que la cinética de reacción no mostró cambios significativos en la absorbancia, aún a la concentración más alta de los compuestos de 10 mM. Del análisis de las cinéticas de reacción de los compuestos *syn-5a* y *11a* se derivó que a la concentración 10.0 mM y al cabo de 2 h el compuesto *syn-5a* alcanzó el equilibrio con un remanente de DPPH del 26%, en tanto que para *11a* resultó ser del 60%. Con el fin de determinar la  $CE_{50}$  del compuesto *11a*, se hicieron mediciones a una concentración mayor de 20 mM. En estas condiciones se obtuvo un 41% de remanente de DPPH al equilibrio, lo cual ocurrió en aproximadamente 7 h.

En concordancia con la literatura,<sup>40</sup> la MLT a la concentración 10.0 mM mostró baja reactividad con el radical DPPH (Figura 15) y una cinética de reacción lenta, de tal manera que al cabo de 24 h es posible que no alcanzara el equilibrio. La MLT presentó un remanente de DPPH del 38%, lo que equivale a una ACRL del 62%, transcurridas 24 h (Tabla 13). El trólox fue más reactivo en 3 órdenes de magnitud con respecto a la MLT (Figura 15, Tabla 14) y su oxidación con DPPH llegó a término dentro de los primeros 10 min.

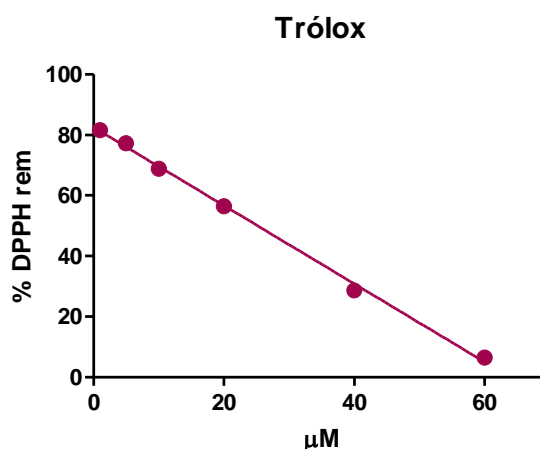


**Figura 15.** Cinética de reacción de la MLT y el trólox a diferentes concentraciones.

El análisis de regresión no lineal de la curva dosis-respuesta de los compuestos *syn-5a*, **11a** y la MLT (Figura 16), así como la cinética de primer orden (regresión lineal) del trólox (Figura 17) permitieron estimar su concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>); es decir, la concentración del compuesto necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%. Así, para un valor menor de CE<sub>50</sub> corresponderá una mayor actividad anti-radical del compuesto de prueba. El coeficiente de determinación de la regresión ( $R^2$ ) fue >0.99 en todos los casos. Como se observa en la Figura 17, las curvas tienden a ser sigmoideas, típicas de los ensayos en los que concentraciones crecientes de analito producen señales decrecientes.



**Figura 16.** Determinación de la CE<sub>50</sub> de los compuestos: (a) *syn-5a*, (b) **11a** y MLT. Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron a la ecuación logística con pendiente de Hill variable utilizando GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).  $Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{((X - \log \text{CE}_{50}))})$ , donde  $X$  es el logaritmo de la dosis,  $Y$  es la respuesta (% DPPH rem) e  $Y$  empieza en Max y se acerca asintóticamente a Min.



**Figura 17.** Determinación de la  $CE_{50}$  del trólox. La curva de dosis-respuesta se ajustó con una ecuación de primer orden utilizando GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).  $Y = -1.292x + 83.53$  ( $R^2 = 0.9979$ ) donde  $X$  es la dosis,  $Y$  es la respuesta (% DPPH rem)

Como se observa en la Tabla 13, el compuesto *syn-5a* presentó la mayor ACRL sobre el radical libre DPPH, con una  $CE_{50}$  de 2.3 mM coincidente con la MLT, en tanto que el compuesto **11a** exhibió una escasa ACRL con una  $CE_{50}$  de 15.8 mM. Los compuestos *anti-5a*, *anti-5a* y *syn-5b* mostraron una incipiente ACRL, en tanto que los compuestos **7a** y **7b** resultaron esencialmente inactivos. La reactividad de los pares diastereoméricos *anti/syn 5a*, **6a** y **7a** por el radical libre DPPH resultó dependiente del tamaño del anillo espirocicloalquilo y aumenta a medida que disminuye el tamaño del anillo en el orden:



Lo anterior puede atribuirse a una estabilización del radical libre inicialmente formado mediante la ruptura homolítica del enlace endocíclico C–C, esta ruptura es favorecida por una disminución en la energía de disociación homolítica como resultado de un aumento de la energía de tensión del anillo de ciclopropano.

**Tabla 13.** ACRL de los compuestos *anti/syn* **5a–7a**, **11a** y de la MLT determinada por el método DPPH

Comp	% de Interacción con DPPH <sup>a</sup>				CE <sub>50</sub> <sup>d</sup> (mM)	R <sup>2</sup>
	1.0 mM <sup>b</sup>	3.0 mM <sup>b</sup>	10.0 mM <sup>b</sup>	10.0 mM <sup>c</sup>		
<i>anti-5a</i>	1.8 ± 0.6	4.5 ± 0.8	14.0 ± 1.0	21.1 ± 1.7	nd <sup>e</sup>	-
<i>syn-5a</i>	13.4 ± 0.9	35.0 ± 1.3	47.8 ± 2.3	73.9 ± 1.3	2.3 ± 0.02	>0.99
<i>anti-6a</i>	3.0 ± 0.3	3.5 ± 1.0	8.3 ± 0.9	18.7 ± 1.5	nd <sup>e</sup>	-
<i>syn-6a</i>	1.8 ± 0.6	3.2 ± 0.5	8.1 ± 1.4	14.0 ± 1.6	nd <sup>e</sup>	
<i>anti-7a</i>	1.6 ± 0.7	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.9	7.5 ± 1.9	nd <sup>e</sup>	-
<i>syn-7a</i>	1.3 ± 0.4	2.0 ± 0.6	2.1 ± 0.6	3.2 ± 1.0	nd <sup>e</sup>	
<b>11a</b>	1.5 ± 0.7	7.7 ± 1.8	15.4 ± 1.9	40.0 ± 4.8	15.8 ± 0.2 <sup>f</sup>	0.99
<b>MLT</b>	11.2 ± 1.3	17.1 ± 1.0	28.1 ± 0.7	61.6 ± 5.0	2.3 ± 0.0	>0.99

<sup>a</sup>Los datos son el promedio de tres experimentos por triplicado ± EE.

<sup>b</sup>Determinada transcurrida 1 h.

<sup>c</sup>Determinadas al estado de equilibrio (~8 h).

<sup>d</sup>Los valores CE<sub>50</sub> (valores de mejor ajuste ± EE) se determinaron por análisis de regresión no lineal de los datos concentración-respuesta mostrados en la Figura 16.

<sup>e</sup>nd: no determinada.

<sup>f</sup>Determinada a una concentración 20 mM y 8 h.

Es de resaltar, que la reactividad de los pares diastereoméricos *anti-syn* **5a**, **6a** y **7a** por el radical libre DPPH resultó dependiente no solo del tamaño del anillo espirocicloalquilo, sino también de la estereoquímica relativa, tal como se observa al comparar *anti-5a* con *syn-5a*. Con respecto a este punto, en el capítulo 4 de

esta tesis (secciones 4.1.1.1. y 4.1.1.2) se demostró que el alargamiento y el consecuente debilitamiento del enlace C3–C9 del anillo de ciclopropano, en el par diastereomérico *anti/syn* **2b**, está influenciado por la estereoquímica relativa de los centros estereogénicos y que la apertura del anillo de ciclopropano favorece a los isómeros *syn*. Con este precedente, la mayor actividad captadora de radicales libres de *syn-5a* con respecto a *anti-5a* se interpreta en términos de una disminución en la energía de disociación homolítica del enlace C3-C9 en *syn-5a*, que podría estabilizar al radical ciclopropano inicialmente formado.

La CE<sub>50</sub> del trólox de 25.18 μM ( $R^2 = 0.9979$ ) por oxidación con DPPH (Tabla 14) es comparable a la determinada previamente<sup>41,42</sup>

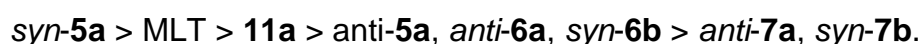
**Tabla 14.** ACRL del trólox determinada por el método DPPH

% de Interacción con DPPH <sup>a</sup>						
1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	40 μM	60 μM	CE <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)
14.5±1.2	19.3±1.5	27.6±2.1	39.9±3.1	66.4±5.1	86.3±6.6	25.2±1.3

<sup>a</sup>Promedio de tres experimentos independientes por triplicado ± EE ( $n = 4$ ).

<sup>b</sup>El valor CE<sub>50</sub> (valor de mejor ajuste ± EE) se determinó por análisis de regresión no lineal de los datos concentración-respuesta mostrados en la Figura 17.

En resumen, la oxidación de los compuestos podría ser un proceso de multietapas, en el que las etapas lentas podrían contribuir a la ACRL sobre el DPPH. Para una mejor comprensión del mecanismo que involucra al radical DPPH y los compuestos analizados, sería importante caracterizar los intermediarios de reacción y los productos. La ACRL de los compuestos *anti-syn* **5a**, **6a** y **7a**, **11a** y la MLT hacia el DPPH decrece en el orden:





## 5.2 Estudios de citotoxicidad

Para llevar al cabo la investigación de la actividad biológica *in vitro* de un compuesto es requisito conocer de manera previa el nivel de citotoxicidad que este puede producir en líneas celulares. De esta forma, conociendo la máxima concentración del compuesto que no altere la morfología o el metabolismo de las células, es posible implementar cualquier otro tipo de ensayo que requiera el uso de la sustancia, sabiendo que la citotoxicidad desarrollada no interferirá en los resultados de estudios posteriores. Los ensayos de citotoxicidad son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares, los efectos adversos que un compuesto puede producir sobre la estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana, del citoesqueleto, metabolismo, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular.<sup>43,44</sup>

La concentración mayor del compuesto que no altera la morfología o el metabolismo celular, es una medida cualitativa de la actividad citotóxica y se denomina Máxima Concentración No Citotóxica (MCNC). Sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario contar con una medida cuantitativa, como la Concentración Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>), definida como la concentración del compuesto que mata la mitad de las células respecto a un control en ausencia de compuesto.

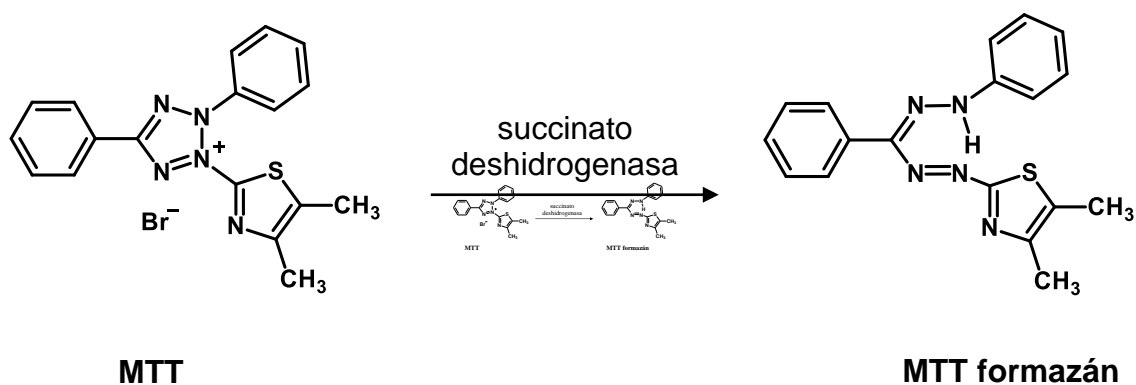
### 5.2.1 Ensayos de citotoxicidad

Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* que permiten predecir los efectos tóxicos de compuestos químicos. Entre ellos se encuentran aquellos que usan colorantes, como cristal violeta y sulforrodamina B, que colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado. Otros métodos se basan en la detección de la liberación de componentes constitutivos

celulares, que miden la actividad de enzimas como la lactato deshidrogenasa y finalmente, aquellos que miden la función metabólica de las células usando por ejemplo sales de tetrazolio (MTT).<sup>45</sup>

#### 5.2.1.1 Reducción metabólica del MTT

Este ensayo se basa en la reducción enzimática del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol (MTT), un compuesto de color amarillo que adquiere una coloración azul por reducción al formazán (Esquema 13), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La reducción metabólica del MTT al formazán ocurre por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa.<sup>46</sup> Este método espectrofotométrico es muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido que queda retenido dentro de las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas.<sup>47,48</sup>



**Esquema 13** Reducción de MTT a MTT formazán.

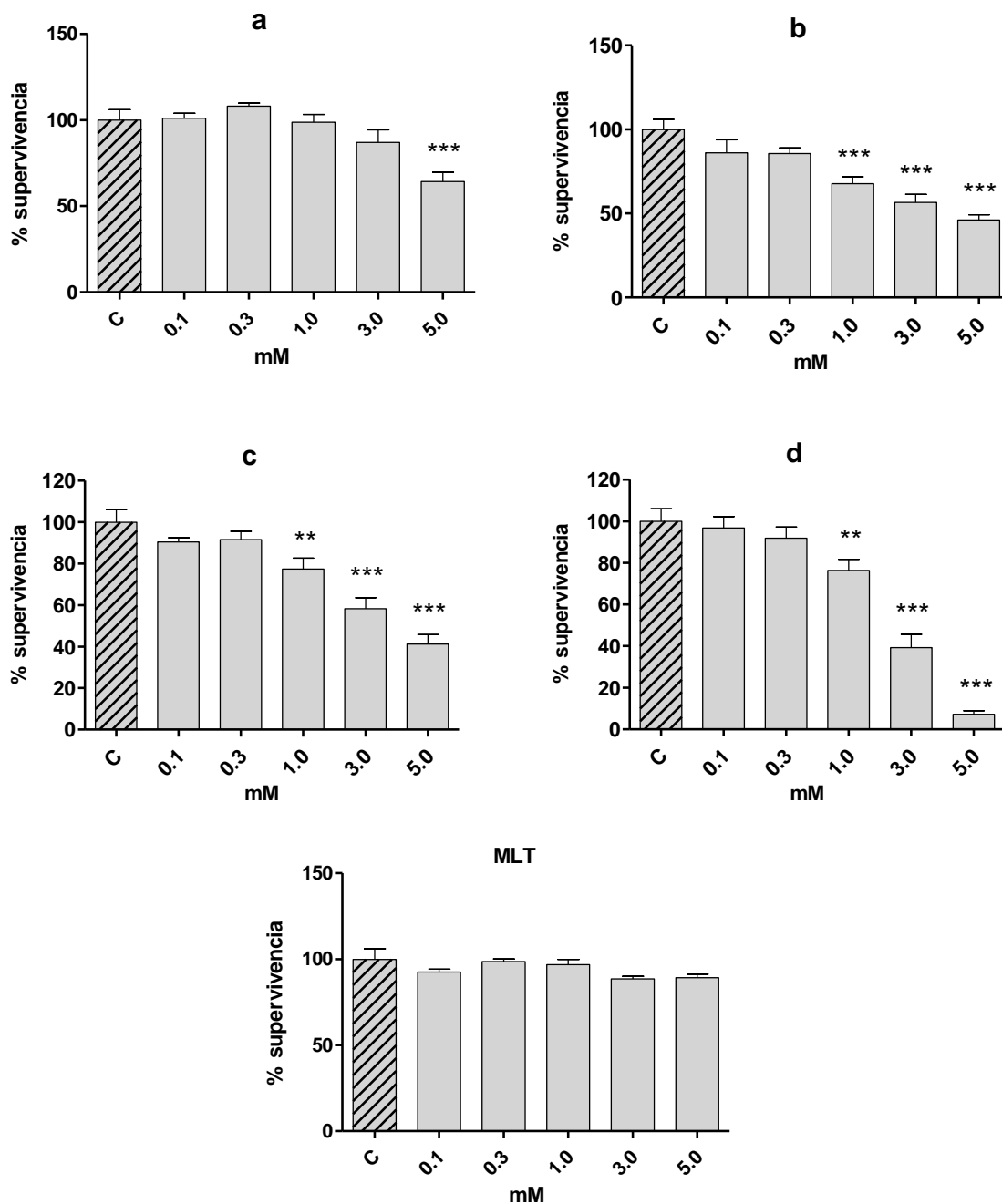
#### 5.2.1.2 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y MLT por el método MTT

El estudio de citotoxicidad se realizó por selección de un compuesto de cada par diastereomérico con base en su reactividad frente al radical libre DPPH y su

disponibilidad, estos fueron los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, además de la homotriptamina **11a** y la MLT. Para determinar la concentración máxima a la que los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y MLT no son citotóxicos, se utilizó como modelo una línea celular derivada de hepatocarcinoma humano (Hep-G2), la cual se trató con los compuestos de interés en un intervalo de concentraciones amplio (0.1–5.0 mM) durante 24 h. Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición las células se incubaron con 20  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL PBS). En los estudios de citotoxicidad se incluyó a la melatonina (MLT) cuya estructura química está relacionada con los compuestos de interés y cuyos efectos no citotóxicos a concentraciones de 0.1  $\mu$ M–10.0 mM hasta 24 h son conocidos.<sup>49</sup> El análisis de citotoxicidad se realizó en condiciones en las que no puede ocurrir la estimulación ni la detención del crecimiento de las células HepG2, ya que las células fueron expuestas a un medio libre de suero. Por lo anterior, en este estudio una reducción en la viabilidad es causada definitivamente por la muerte celular. Cada ensayo se realizó tres veces por cuadruplicado usando como control células no tratadas expuestas a 0.5% DMSO (vehículo). Los valores de comparación se hicieron sobre una base de concentración citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>).

En la Figura 18 se muestra el porcentaje de supervivencia de las células HepG2 como resultado de su exposición con los compuestos evaluados *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y MLT a diferentes concentraciones (0.1–5.0 mM).

El análisis de los resultados evidenció que, en el intervalo de concentraciones evaluado (0.1–5.0 mM), la citotoxicidad de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y MLT es dosis-dependiente. Los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y MLT no mostraron actividad citotóxica a las concentraciones 0.1 mM y 0.3 mM. A partir de la concentración 1.0 mM se observaron efectos citotóxicos, en los que el porcentaje de supervivencia de las células HepG2 disminuyó gradualmente con el aumento de la concentración (Figura 18).



**Figura 18.** Influencia de la concentración sobre la acción citotóxica de los compuestos: (a) *syn-5a*, (b) *anti-6a*, (c) *anti-7a*, (d) **11a** y **MLT** en células HepG2. Cada grupo representa el promedio de tres experimentos independientes por cuadruplicado (media  $\pm$  EE). C: control (células no tratadas). Coeficiente de kurtosis  $>0.05$ . El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA; \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al control.

Adicionalmente, se realizaron tres ensayos a concentraciones intermedias 0.4 mM, 0.6 mM y 0.8 mM con el fin de detectar la posibilidad de la presencia del fenómeno de hormesis.<sup>50</sup> Estos ensayos demostraron que no existe hormesis, ya que si así fuese, a las concentraciones antes indicadas se esperaría una supervivencia menor a la observada a la concentración 1.0 mM, resultando en una dosis-respuesta bifásica que exhibe efectos opuestos en dosis bajas y altas. El porcentaje de supervivencia a las concentraciones intermedias 0.4 mM, 0.6 mM y 0.8 mM resultó comparable al control.

Las gráficas de los datos experimentales, en la Figura 18, muestran la media y el error estándar (EE). En todos los casos se observó una distribución normal con un coeficiente de kurtosis  $>0.05$  (medida de distribución que permite identificar la forma en que se separan o aglomeran los valores de acuerdo a su representación gráfica). Este criterio es de suma importancia ya que para la mayoría de los procedimientos de la estadística de inferencia se requiere que los datos se distribuyan normalmente. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación *post hoc* de Bonferroni con el objetivo de determinar qué medias difieren significativamente con respecto al control. En otras palabras, determinar diferencias estadísticamente significativas entre las células expuestas y las no expuestas (nivel  $\leq 0.05$ ), encontrándose para el grupo analizado de compuestos ***syn-5a***, ***anti-6a***, ***anti-7a*** y ***11a*** valores de probabilidad  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$  con respecto al control.

Como puede observarse, tres de los cuatro compuestos ***anti-6a***, ***anti-7a*** y ***11a*** presentaron citotoxicidad baja a la concentración 1.0 mM, con un porcentaje de supervivencia después del tratamiento en un intervalo del 68% al 77% (Tabla 15). Adicionalmente se determinó que a la concentración 5.0 mM los compuestos ***anti-6a***, ***anti-7a*** y ***11a*** mostraron un porcentaje letal superior al 50%, siendo el compuesto ***11a*** el que mostró mayor citotoxicidad, con un porcentaje de supervivencia del 7%. Por su parte el compuesto ***syn-5a*** mostró actividad

citotóxica sólo hasta alcanzar la concentración máxima 5.0 mM, con un porcentaje de supervivencia moderado del 59%. Se determinó que a concentraciones  $\leq 0.8$  mM ninguno de los compuestos fue citotóxico. Cabe señalar que la MLT no mostró citotoxicidad a ninguna de las concentraciones utilizadas en los ensayos, en coincidencia con lo descrito en la literatura.<sup>49,51</sup>

**Tabla 15.** Influencia de la concentración sobre la acción citotóxica de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y MLT en células HepG2

Comp	% Supervivencia <sup>a</sup>					CC <sub>50</sub> [mM] <sup>b</sup>
	0.1 mM	0.3 mM	1.0 mM	3.0 mM	5.0mM	
<i>syn-5a</i>	101 ± 3 <sup>c</sup>	108 ± 2 <sup>c</sup>	99 ± 5	87 ± 7	64 ± 5	> 5.00
<i>anti-6a</i>	86 ± 8	86 ± 3	68 ± 4	57 ± 5	46 ± 3	4.20 ± 0.10
<i>anti-7a</i>	91 ± 2	92 ± 4	77 ± 5	58 ± 5	41 ± 5	3.84 ± 0.06
<b>11a</b>	97 ± 6	92 ± 5	76 ± 5	39 ± 6	7 ± 2	1.99 ± 0.04
<b>MLT</b>	93 ± 2	99 ± 2	97 ± 3	89 ± 1	89 ± 2	> 5.00

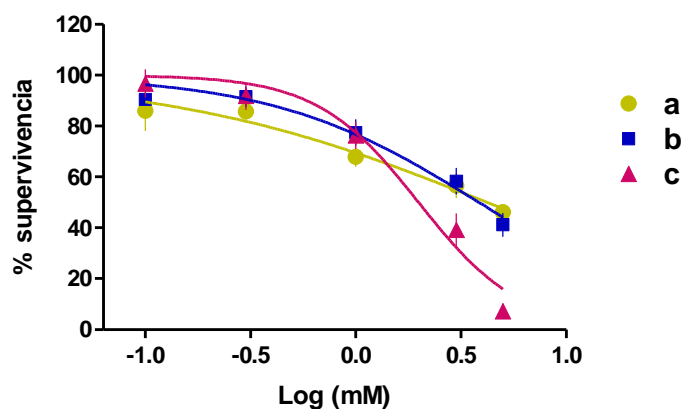
<sup>a</sup>Los datos son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  EE ( $n = 4$ ).

<sup>b</sup>Los valores CC<sub>50</sub> (valores de mejor ajuste  $\pm$  EE) se determinaron por análisis de regresión no lineal de los datos concentración-respuesta mostrados en la Figura 19.

<sup>c</sup>Al % de supervivencia pueden contribuir diferencias en la concentración celular inicial que son estadísticamente no significativas ( $P > 0.5$ ).

Los valores de la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) derivados de las relaciones concentración-respuesta (Tabla 15) indican que la potencia citotóxica de la homotriptamina **11a** es aproximadamente 2 veces mayor que la de los compuestos *anti-6a* y *anti-7a*, al cabo de 24 h. El valor CC<sub>50</sub> de **11a** fue  $1.99 \pm 0.04$  mM, en tanto que la CC<sub>50</sub> para *anti-6a* y *anti-7a* resultó ser  $4.20 \pm 0.10$  mM y

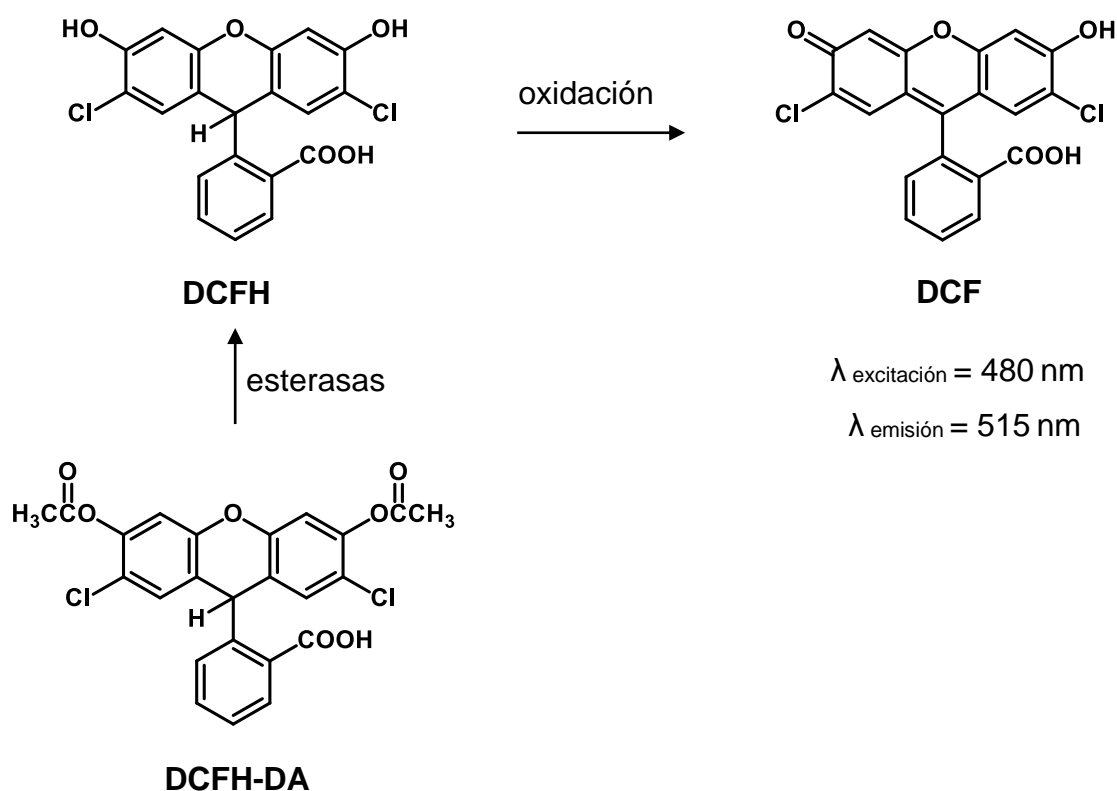
3.84 ± 0.06 mM, por lo que la citotoxicidad de los compuestos aumenta en el orden *anti-6a* < *anti-7a* < **11a**. Del análisis de los datos de la Tabla 15 se infiere que la CC<sub>50</sub> del compuesto *syn-5a* y la MLT está por encima de la concentración máxima evaluada en este estudio (5.0 mM). En la Figura 19 se muestran las curvas concentración-respuesta de los compuestos *anti-6a*, *anti-7a* y **11a**.



**Figura 19.** Determinación de la CC<sub>50</sub> de los compuestos (a) *anti-6a*, (b) *anti-7a* y (c) **11a** en células HepG2. Las células fueron incubadas por 24 h a diferentes concentraciones (0.1 – 5.0 mM) de los compuestos *anti-6a*, *anti-7a* y **11a**. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes ± EE ( $n = 4$ ). Los puntos representan la viabilidad celular como porcentaje de los controles no tratados. Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron a la ecuación logística con pendiente de Hill variable utilizando GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).  $Y = \text{Max} / (1 + 10^{((\log \text{CC}_{50} - X) \cdot \text{pendiente}))}$ , donde  $X$  es el logaritmo de la dosis,  $Y$  es la respuesta (% supervivencia) e  $Y$  empieza en Max y se acerca asintóticamente a Min.

### 5.3 Actividad antioxidante por el bio-ensayo DCFH-DA

El bio-ensayo DCFH-DA (diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína) tiene lugar en células vivas. El DCFH-DA es una molécula permeable para las células, que se hidroliza en el citoplasma por las esterasas a DCFH (2'-7'-diclorodihidrofluoresceína), que a su vez se oxida a DCF (2'-7'-diclorofluoresceína) por acción de ERO tales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), entre otros (Esquema 14).<sup>52</sup> El DCF es una molécula altamente fluorescente y su emisión a 515 nm es linealmente dependiente de la cantidad de ERO presentes en la muestra, por lo que es posible cuantificar los niveles de radicales libres en la línea celular tratada con los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y la MLT comparándolos con un patrón de oxidación producido por cloruro férrico ( $FeCl_3$ ).

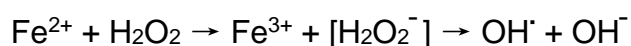


**Esquema 14** Mecanismo de des-esterificación de DCFH-DA a DCF fluorescente por ERO.



### 5.3.1 Producción de radicales $\cdot\text{OH}$ con cloruro férrico

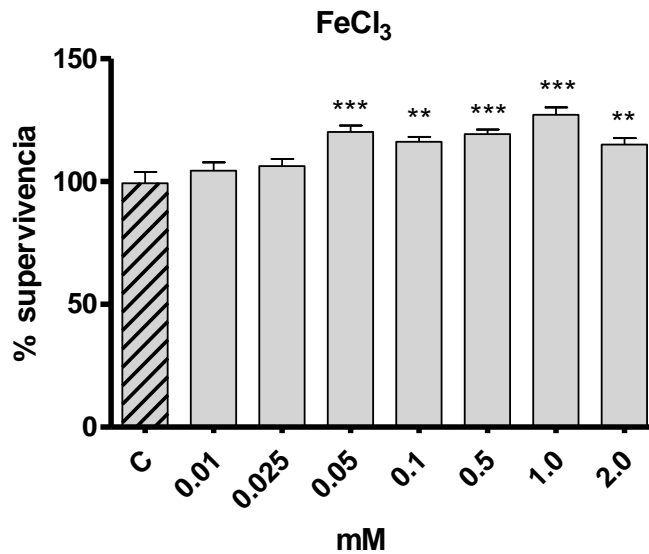
Las propiedades redox y la química de coordinación del hierro son necesarias para varias funciones catalíticas de la célula tales como transporte de electrones, respiración celular, proliferación celular, diferenciación celular y regulación de genes.<sup>53,54</sup> Sin embargo las concentraciones excesivas de hierro pueden tener efectos pro-oxidativos, ya que el hierro es capaz de generar radicales hidroxilo vía la reacción de Fenton/Haber-Weiss, resultando en estrés oxidativo que participa en diversos procesos patológicos tales como la peroxidación lipídica.<sup>55-57</sup>



En vista de lo anterior y con el objetivo de determinar el efecto potencial pro- y antioxidante de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a** se utilizó cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) como generador de ERO en la línea celular HepG2. Adicionalmente, la actividad de *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a** fue relacionada cualitativa y cuantitativamente con el perfil del trólox, que es un antioxidante conocido.

### 5.3.2 Evaluación de la citotoxicidad del cloruro férrico

Inicialmente se exploró la citotoxicidad del  $\text{FeCl}_3$  usando el ensayo de DCFH-DA. El procedimiento consistió en pre-incubar células HepG2 con concentraciones crecientes de  $\text{FeCl}_3$  (0.01–2.0 mM) durante 24 h. Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición, las células se incubaron con DCFH-DA (20  $\mu\text{M}$ ) en condiciones estándar. Los resultados presentados en la Figura 20 muestran que no existe disminución en el porcentaje de viabilidad celular en ninguno de los casos con respecto al control, por lo que el  $\text{FeCl}_3$  puede ser utilizado hasta la concentración de 2.0 mM para generar ERO sin producir citotoxicidad. Los porcentajes de supervivencia superiores al 100% pueden obedecer a que exista una mínima diferencia en la cantidad de células dispuestas en cada pozo y después de 24 h de incubación las células proliferan magnificando el porcentaje.

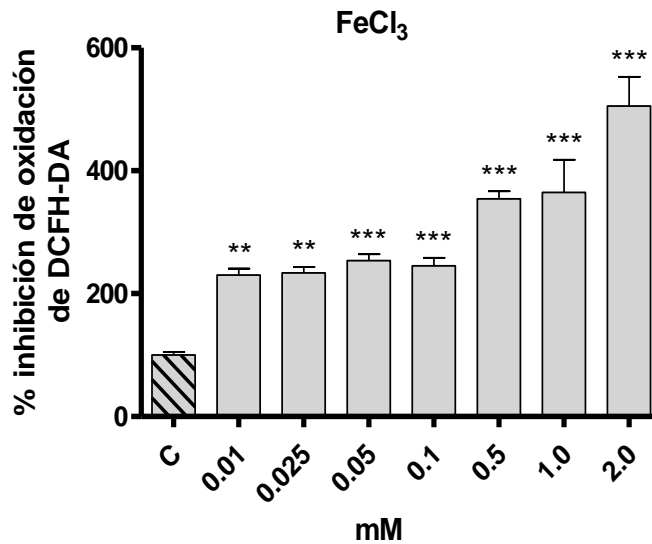


**Figura 20.** Evaluación de la citotoxicidad del cloruro férrico sobre células HepG2. Cada grupo representa el promedio de tres experimentos independientes por cuadruplicado (media  $\pm$  EE). C: control (células no tratadas). Coeficiente de kurtosis  $>0.05$ . Análisis de datos ANOVA. Prueba *post hoc* (de Bonferroni)  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$  con respecto al control.

### 5.3.3 Determinación de ERO generadas por cloruro férrico

Como parte del bio-ensayo DCFH-DA se requiere determinar la concentración óptima de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) que actúe como agente oxidante intracelular y así, genere ERO de manera significativa con respecto al control (100% de ERO basal, células sin  $\text{FeCl}_3$ ) (Figura 21).

El procedimiento consistió en pre-incubar células HepG2 con concentraciones crecientes de  $\text{FeCl}_3$  (0.01–2.0 mM) durante 24 h. Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición, las células se incubaron con DCFH-DA (20  $\mu\text{M}$ ) en condiciones estándar. Los resultados presentados en la Figura 21 demuestran que el porcentaje de ERO aumenta en función de la exposición de las células a concentraciones crecientes de  $\text{FeCl}_3$ .



**Figura 21.** Determinación de ERO generadas por cloruro férrico sobre células HepG2. Cada grupo representa el promedio de tres experimentos independientes por cuadruplicado (media  $\pm$  EE). C: control (células no tratadas). Coeficiente de kurtosis  $>0.05$ . Análisis de datos ANOVA. Prueba *post hoc* (de Bonferroni)  $**p<0.01$  y  $***p<0.001$  con respecto al control.

En particular, la incubación de células HepG2 con 0.01 mM de FeCl<sub>3</sub> y 20  $\mu$ M de DCFH-DA generó poco más del doble de ERO con respecto a aquellas especies que se encuentran de manera basal en el cultivo celular (diferencia significativa con respecto al control  $**p<0.01$ ). Por lo anterior, la concentración de FeCl<sub>3</sub> 0.01 mM se eligió como óptima en la inducción de ERO en el ensayo de DCFH-DA y se procedió a evaluar las propiedades anti- y pro-oxidantes del trólox.

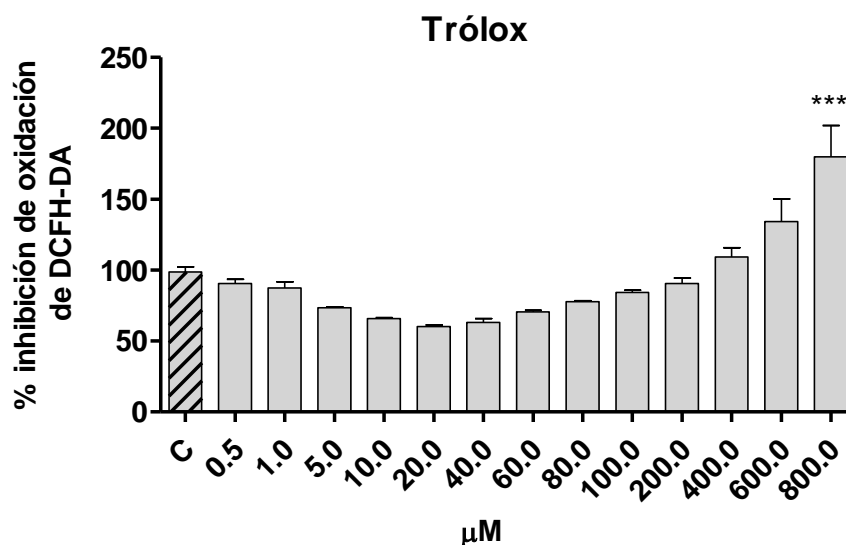
#### 5.3.4 Determinación del potencial anti- y pro-oxidante del trólox

Como se describe a continuación, en este estudio el trólox se usó como control positivo para validar el método DCFH-DA. Cabe señalar que las propiedades antioxidantes y pro-oxidantes del trólox se han descrito en trabajos relacionados con la oxidación inducida por Cu<sup>2+</sup> de lipoproteínas de baja densidad<sup>58</sup> y con la

inducida por *t*-BuOOH en cultivos celulares,<sup>59</sup> demostrándose que la curva dosis-respuesta del trólox es bifásica.

La actividad anti- y pro-oxidante del trólox se evaluó usando el ensayo de DCFH-DA. Las células HepG2 fueron tratadas con concentraciones crecientes de trólox (0.5–800  $\mu$ M) en ausencia (Figura 22) y presencia de FeCl<sub>3</sub> (10  $\mu$ M, Figura 23) durante 24 h. Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición, las células se incubaron con DCFH-DA (20  $\mu$ M) en condiciones estándar.

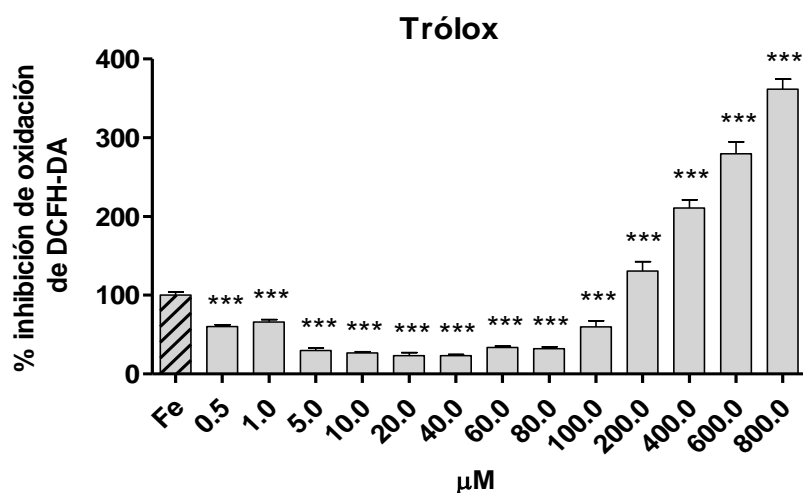
En ausencia de FeCl<sub>3</sub> y solo a la concentración más alta evaluada de trólox 800  $\mu$ M se detectó un aumento significativo ( $p < 0.005$ ) en el porcentaje de ERO con respecto al control (81.2%  $\pm$  18).



**Figura 22.** Determinación de la actividad anti- y pro-oxidante del trólox sobre células HepG2 en ausencia de FeCl<sub>3</sub>. Cada grupo representa el promedio de dos experimentos independientes por cuadruplicado (media  $\pm$  EE). C: control (células no tratadas). Coeficiente de kurtosis  $> 0.05$ . Análisis de datos ANOVA. Prueba *post hoc* (de Bonferroni) \*\*\*  $p < 0.001$  con respecto al control.

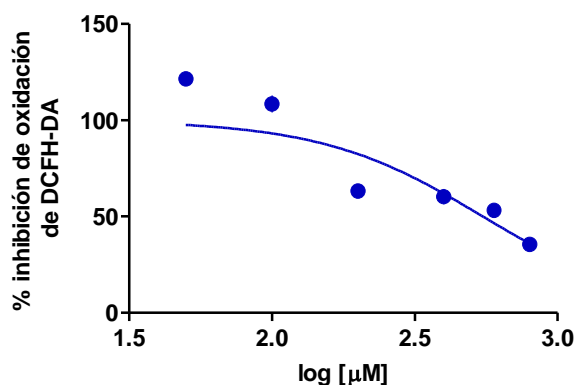
Los resultados demostraron que en la primera fase (Figura 23), el trólox decrece la oxidación de DCFH inducida por FeCl<sub>3</sub> de manera dosis dependiente a dosis en el

intervalo de 0.5–100  $\mu\text{M}$ . En la segunda fase, el trólox aumenta la oxidación de DCFH inducida por  $\text{FeCl}_3$  a concentraciones arriba de 200  $\mu\text{M}$ . Estos resultados son similares a los descritos previamente para el trólox en cultivos celulares.<sup>59</sup> En conclusión, el ensayo basado en células permite la detección de la actividad antioxidante significativa ( $p < 0.001$ ) del tólox a la concentración más baja analizada en este estudio de 0.5  $\mu\text{M}$ . Los resultados confirman que el ensayo DCFH-DA basado en células es sensible a la detección de las propiedades anti- y pro-oxidantes del trólox.



**Figura 23.** Determinación de la actividad anti- y pro-oxidante del trólox sobre células HepG2 en presencia de  $\text{FeCl}_3$ . Cada grupo representa el promedio de dos experimentos independientes por cuadruplicado (media  $\pm$  EE). Fe: control positivo (células expuestas con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ ). Coeficiente de kurtosis  $> 0.05$ . Análisis de datos ANOVA. Prueba *post hoc* (de Bonferroni) \*\*\*  $p < 0.001$  con respecto al control.

La  $CI_{50}$  del trólox ( $1.05 \pm 0.27 \mu\text{M}$ , Tabla 16) se calculó usando la regresión logarítmica de la curva dosis-respuesta después de la sustracción del valor intrínseco de fluorescencia del control sin  $\text{FeCl}_3$  (Figura 24). El control positivo usado como referencia 100% contiene  $\text{FeCl}_3$  ( $10 \mu\text{M}$ ).

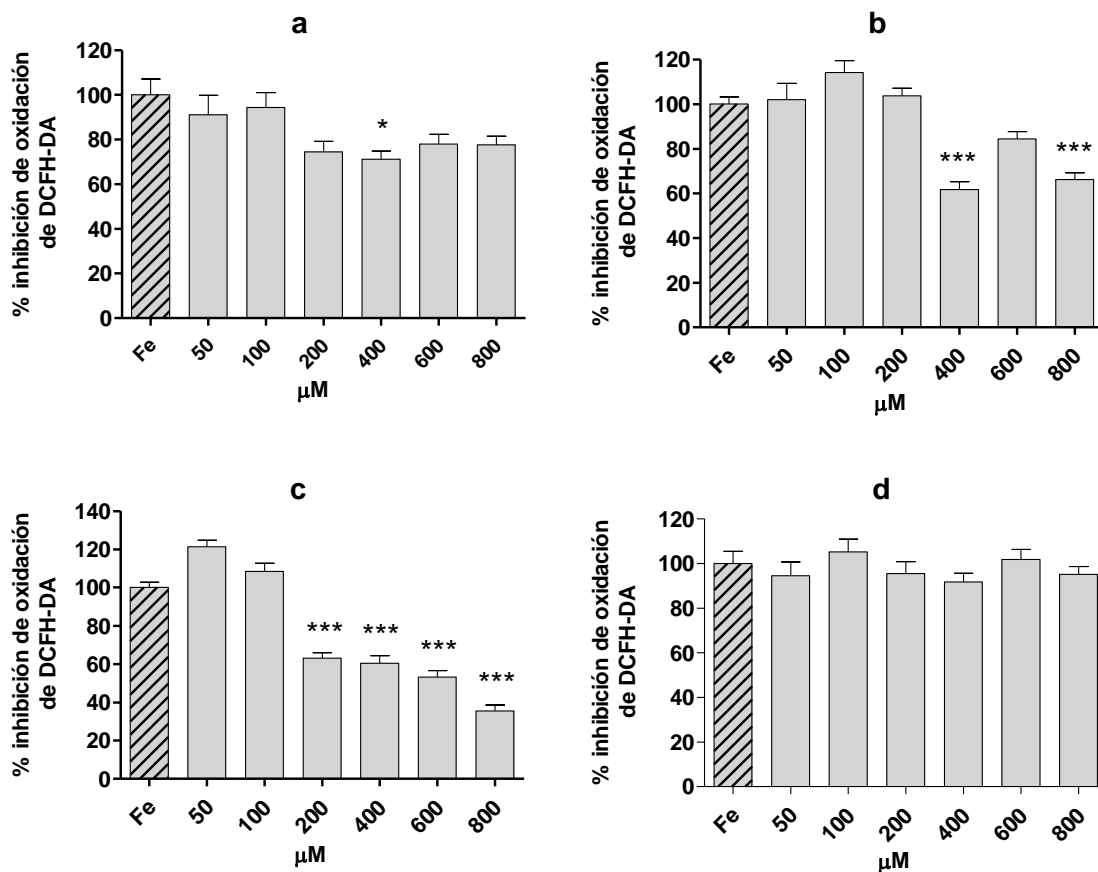


**Figura 24.** Determinación de la  $CI_{50}$  de **3a**. La curva de dosis-respuesta se ajustó con una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).  $Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{((\log CI_{50} - X) * \text{pendiente}))}$ , donde X es el logaritmo de la dosis, Y es la respuesta (% inhibición de oxidación de DCFH-DA) e Y empieza en Max y se acerca asintóticamente a Min.

### 5.3.5 Determinación del potencial antioxidante de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a**

Para valorar la actividad antioxidante de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a**, de acuerdo al bio-ensayo DCFH-DA, las células HepG2 se preincubaron durante 24 h con concentraciones crecientes de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a** ( $50\text{--}800 \mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  ( $10 \mu\text{M}$ ). Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición, las células se incubaron con DCFH-DA ( $20 \mu\text{M}$ ) en condiciones estándar (Figura 25). En ausencia de  $\text{FeCl}_3$  ninguno de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a** mostró ser pro-oxidante,

ya que no hubo generación de ERO con respecto a aquellas que se encuentran de manera basal en el cultivo celular.

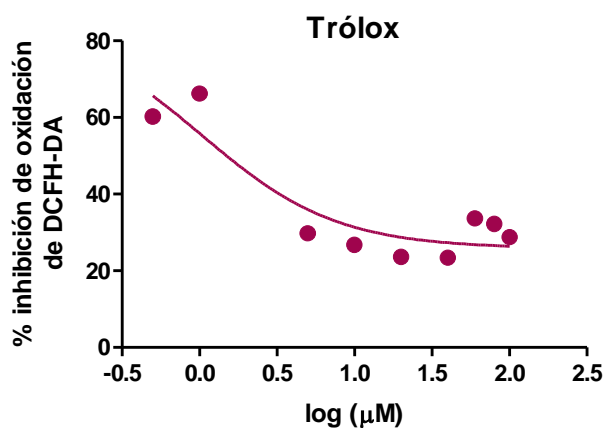


**Figura 25.** Determinación del potencial antioxidante de los compuestos (a) *syn-5a*, (b) *anti-6a*, (c) *anti-7a* y (d) **11a** sobre células HepG2 en presencia de FeCl<sub>3</sub>. Cada grupo representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado (media ± EE). Fe: control positivo (células expuestas con 10 μM de células sin FeCl<sub>3</sub>). Coeficiente de kurtosis >0.05. Análisis de datos ANOVA. Prueba *post hoc* (de Bonferroni) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al control.

Las gráficas en la Figura 25 y los datos recopilados en la Tabla 16 muestran que el compuesto **11a** no tuvo actividad antioxidante a ninguna de las concentraciones evaluadas. A concentraciones bajas de 50–100 μM ninguno de los compuestos

*syn-5a*, *anti-6a* y *anti-7a* inhibe la oxidación de DCFH. A la concentración 200  $\mu\text{M}$  los compuestos *syn-5a* y *anti-6a* son ligeramente pro-oxidantes, sin embargo este dato no es estadísticamente significativo ( $P>0.5$ ), mientras que el compuesto *syn-5a* inhibe significativamente la oxidación de DCFH en  $36.8 \pm 0.02\%$ . Los compuestos *anti-6a* y *anti-7a* presentan propiedades antioxidantes a concentraciones de 400 y 800  $\mu\text{M}$ , en tanto que el compuesto *syn-5a* mantuvo el mismo perfil de poca actividad antioxidante a las concentraciones evaluadas.

La  $\text{Cl}_{50}$  se calculó usando la regresión logarítmica de la curva dosis-respuesta después de la sustracción del valor intrínseco de fluorescencia del control sin  $\text{FeCl}_3$  (Figura 26). El valor  $\text{Cl}_{50}$  (Tabla 16) del compuesto más activo *anti-7a* fue de  $548.1 \pm 0.04 \mu\text{M}$ .



**Figura 26.** Determinación del trólox. La curva de dosis-respuesta se ajustó con una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).  $Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{((\log \text{Cl}_{50} - X) \cdot \text{pendiente}))}$ , donde X es el logaritmo de la dosis, Y es la respuesta (% inhibición de oxidación de DCFH-DA) e Y empieza en Max y se acerca asintóticamente a Min.



**Tabla 16.** Actividad antioxidante de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a** y del trólox en presencia de FeCl<sub>3</sub>

Comp	% Inhibición de oxidación de DCFH-DA <sup>a</sup>						Cl <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)
	50 μM	100 μM	200 μM	400 μM	600 μM	800 μM	
<i>syn-5a</i>	9.0 ± 1.8	5.8 ± 0.3	25.7 ± 2.3	29.0 ± 3.3	22.1 ± 2.6	22.4 ± 3.1	nd <sup>c</sup>
<i>anti-6a</i>	-	-	-	38.3 ± 0.3	15.6 ± 0.01	33.9 ± 0.2	nd <sup>c</sup>
<i>anti-7a</i>	-	-	36.8 ± 0.02	39.7 ± 1.2	46.8 ± 0.7	64.4 ± 0.2	548.10 ± 0.04
<b>11a</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Trolóx</b>	nd <sup>e</sup>	44.6 ± 3.2	30.9 ± 5.6 <sup>d</sup>	110.8 ± 4.5 <sup>d</sup>	179.7 ± 9.2 <sup>d</sup>	261.8 ± 6.5 <sup>d</sup>	1.05 ± 0.27 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Los datos son el promedio de tres experimentos independientes ± EE ( $n = 3$ ).

<sup>b</sup>Los valores Cl<sub>50</sub> (valores de mejor ajuste ± EE) se determinaron por análisis de regresión no lineal de los datos concentración-respuesta mostrados en las Figuras 24 y 26.

<sup>c</sup>nd: no determinada.

<sup>d</sup>Actividad pro-oxidante.

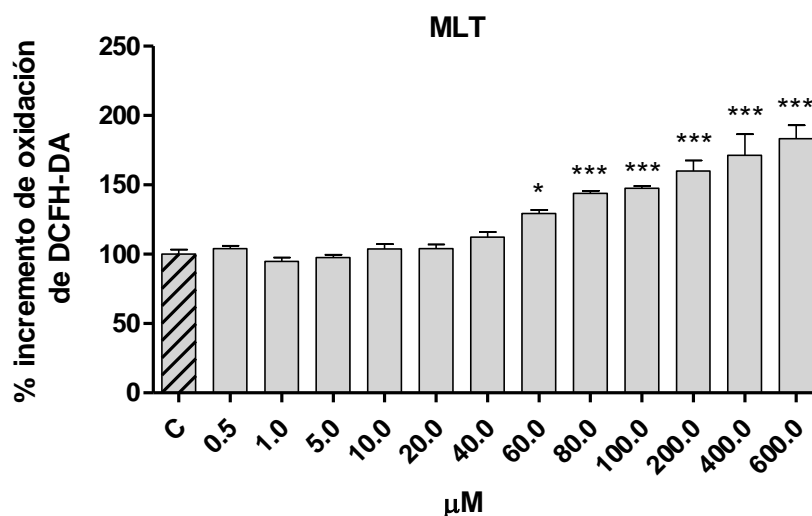
<sup>e</sup>Ver Figura 23.

<sup>f</sup>Efecto anti-radical en DPPH Cl<sub>50</sub> 0.013 mg/mL (51.93 μM).<sup>60</sup>

Cabe resaltar que los resultados obtenidos por el método DCFH-DA (Tabla 16) con aquellos previamente descritos usando el método DPPH (Tabla 13) no son coincidentes. Lo anterior se debe a que las metodologías *in vitro* son frecuentemente muy específicas para un modo de acción y en este caso puede ser un reflejo de la diferencia en la reactividad de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a** con respecto a los indicadores DPPH y DCFH-DA.

### 5.3.6 Evaluación de la producción de ERO por MLT

De manera general, se sabe que la MLT es efectiva en neutralizar especies reactivas de oxígeno (ERO). Sin embargo, también es conocido que a concentraciones de orden micro- y milimolar la MLT puede comportarse como prooxidante.<sup>49,51,61</sup> Con estos antecedentes, el efecto de la concentración de MLT sobre células HepG2 se determinó en el intervalo de 0.5–600  $\mu\text{M}$ , de acuerdo al bio-ensayo DCFH-DA (Figura 27). El control usado como referencia 100% no contiene MLT ni disolvente. Las células HepG2 se pre-incubaron durante 24 h con concentraciones crecientes de MLT (0.5–600  $\mu\text{M}$ ), cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición, las células se incubaron con DCFH-DA (20  $\mu\text{M}$ ) en condiciones estándar.



**Figura 27.** Evaluación de la producción de ERO después de la exposición de células HepG2 a la MLT. Cada grupo representa el promedio de dos experimentos independientes por cuadruplicado (media  $\pm$  EE). C: control (células no tratadas). Coeficiente de kurtosis  $>0.05$ . Análisis de datos ANOVA. Prueba *post hoc* (de Bonferroni) \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al control.

Los resultados mostraron que la exposición de las células HepG2 a concentraciones de 0.5–20  $\mu\text{M}$  de MLT generó ERO de manera comparable al

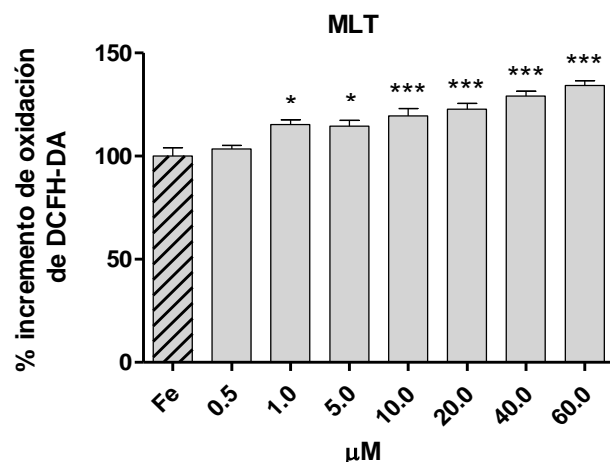
control. Sin embargo, a partir de la concentración de MLT 60  $\mu\text{M}$  se detecta un aumento significativo en el porcentaje de ERO ( $p < 0.05$ ) (29% mayor que el control). Este aumento resultó dosis-dependiente y fue 83% mayor que el control a la concentración 600  $\mu\text{M}$  (Tabla 17). Cabe señalar que en un estudio previo,<sup>49</sup> en el que se usó como blanco celular el nivel intracelular de glutatión reducido (GSH), se determinó que la MLT presenta un efecto antioxidante a concentraciones menores entre 0.1–10  $\mu\text{M}$  y por un tiempo de incubación de 24 h.

**Tabla 17.** Actividad pro-oxidante de la MLT en ausencia de  $\text{FeCl}_3$

		% Incremento de oxidación de DCFH-DA <sup>a</sup>							
		20 $\mu\text{M}$	40 $\mu\text{M}$	60 $\mu\text{M}$	80 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{M}$	600 $\mu\text{M}$
MLT	-		12 $\pm$ 4	29 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2	48 $\pm$ 2	60 $\pm$ 8	71 $\pm$ 12	83 $\pm$ 7

<sup>a</sup>Los datos son el promedio de dos experimentos independientes  $\pm$  EE ( $n = 4$ ).

Por lo anterior, se decidió valorar el potencial antioxidante de la MLT a concentraciones menores en el intervalo 0.5–60  $\mu\text{M}$ . El procedimiento consistió en preincubar las células HepG2 durante 24 h con concentraciones crecientes de MLT en presencia de  $\text{FeCl}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ). Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición, las células se incubaron con DCFH-DA (20  $\mu\text{M}$ ) en condiciones estándar (Figura 28).



**Figura 28.** Evaluación de la producción de ERO después de la exposición de células HepG2 a la MLT y FeCl<sub>3</sub>. Cada grupo representa el promedio de dos experimentos independientes por cuadruplicado (media ± EE). Fe: control positivo (células expuestas con 10 μM de FeCl<sub>3</sub>). Coeficiente de kurtosis >0.05. Análisis de datos ANOVA. Prueba *post hoc* (de Bonferroni) \**p*<0.05 y \*\*\**p*<0.001 con respecto al control.

Los resultados mostraron que aún a la concentración más baja de MLT de 0.5 μM no tuvo actividad antioxidante. A partir de la concentración 1.0 μM se observa un efecto pro-oxidante significativo de la MLT (*p*<0.05) (15% mayor que el control positivo, Tabla 18) y un aumento de ERO dosis-dependiente con respecto a las ERO generadas únicamente por FeCl<sub>3</sub> (control positivo).

**Tabla 18** Actividad pro-oxidante de la MLT en presencia de FeCl<sub>3</sub>

	% Incremento de oxidación de DCFH-DA <sup>a</sup>						
	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM	10 μM	20 μM	40 μM	60 μM
<b>MLT</b>	-	15 ± 2	15 ± 3	19 ± 4	23 ± 3	29 ± 2	34 ± 2

<sup>a</sup>Los datos son el promedio de dos experimentos independientes ± EE (*n* = 4).

## 6. CONCLUSIONES

Se realizó la síntesis de una serie de espirocicloalquinoxindoles acetamidometan-sustituídos *anti/syn*-**5a-c**, **-6a**, **-6f** y **-7a** análogos de la MLT, conformacionalmente restringidos en la cadena lateral amidoetano en C3, a partir de 3-cianometil oxindoles **1a-f**. La espectrometría de masa fue esencial en la caracterización de estos compuestos. Las técnicas de cristalización, los estudios por difracción de rayos-X, la interpretación rigurosa de los espectros de RMN, con particular atención a los experimentos NOESY por correlación a través del efecto nuclear de Overhauser fueron fundamentales en la asignación de la estereoquímica relativa de los compuestos.

La reactividad limitada hacia la abstracción de H<sup>•</sup> por DPPH de los oxindoles espirocíclicos, caracterizados por la restricción conformacional de la cadena *N*-acetil-2-aminoetil, se atribuye a la pérdida de aromaticidad del sistema indólico. En concordancia con la literatura, la MLT mostró baja reactividad con el radical DPPH y una cinética de reacción lenta.

El alargamiento de la cadena en C3 en un metileno de la MLT resultó en la pérdida de la actividad antioxidante debido al aumento de la libertad conformacional.

La respuesta de los compuestos evaluados hacia la inhibición de la oxidación de DCFH-DA indicó que el tamaño del anillo homocíclico influye en la capacidad de reducir la oxidación inducida por FeCl<sub>3</sub> en células, aumentando a medida que aumenta el tamaño del anillo. En oposición, la MLT mostró actividad pro-oxidante aún a la concentración menor analizada de 1.0 μM.

Se confirmó el efecto hormético del trólox usado como estándar en el ensayo de DCFH-DA.

## 7. PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA

### 7.1 General

Todas las materias primas fueron adquiridas de Sigma-Aldrich Chemical Co. y utilizadas sin purificación adicional. Los disolventes usados fueron grado reactivo y en el caso de la DMF (dimetilformamida), ésta fue secada sobre óxido de bario. La cromatografía en capa fina (CCF) se llevó a cabo en placas precoladas con sílica gel 60 F254 ó placas precoladas con óxido de aluminio 60 F254 neutro (se indica), con indicador fluorescente (Merck Chem. Co.) y los productos se visualizaron con luz ultravioleta a 254 nm. Los productos se purificaron en columna cromatográfica flash utilizando sílica gel 60 (230-400 mallas, Merck Chem. Co.) u óxido de aluminio 90 neutro (70-230 mesh). Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

### 7.2 Mediciones por CG/EM

Las mediciones por CG/EM (cromatografía de gases/espectrometría de masa) se efectuaron en un cromatógrafo de gases Varian CP 3800 acoplado a un detector de masa selectivo Varian Saturn 2000. Se usó una columna cromatográfica capilar CP-SIL 5, de 30 m de largo y 0.25 mm d.i., cubierta en su capa interna con un soporte de sílica de 0.25  $\mu\text{m}$ . Para todos los experimentos se eligió el siguiente programa de CG: se usó un controlador diferencial de caudal en la cámara de inyección, la cual se calentó a 200 °C para garantizar la volatilización rápida. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de solución con un flujo de He de 1 mL/min y la temperatura de la columna al momento de la inyección fue de 70 °C. Se usó un programa que permitió aumentar linealmente la temperatura de la columna con el tiempo a razón de 30 °C/min, considerando que la temperatura de la columna deberá ser suficientemente alta para que el análisis se efectúe en un plazo razonable y

suficientemente baja para lograr la separación deseada de los componentes de la mezcla, el tiempo total del análisis fue de 20 min.

La temperatura de la línea de transferencia del CG al EM se ajustó a 230 °C y la temperatura de la fuente del EM se mantuvo a 170 °C. La ionización del eluente del CG se llevó a cabo por impacto electrónico (IE) a 70 eV.

### **7.3 Determinación de los espectros de masa de alta resolución**

La determinación de la masa exacta de los compuestos se realizó por análisis de los espectros de masa de alta resolución, obtenidos en la Universidad de California, Riverside CA usando un equipo Agilent LCTOF, que emplea una ionización multimodo que usa técnicas de ionización por electroespray y ionización química a presión atmosférica (electrospray ionization/atmospheric pressure chemical ionization, ESI/APCI, de sus siglas en inglés).

### **7.4 Determinación de los espectros de RMN**

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos en espectrómetros Varian Mercury operados a 300 y 74.5 MHz respectivamente, utilizando  $\text{SiMe}_4$  como referencia interna. La multiplicidad de señales se indica por una o más de las siguientes abreviaciones: s (simple), d (doble), t (triple), m (múltiple), a (ancha). Ver Tablas de datos y espectros selectos de RMN de  $^1\text{H}$  en Apéndice.

### **7.5 Determinación de la estructura cristalina por difracción de rayos-X**

Las estructuras cristalinas se determinaron en un difractómetro Brucker-Nonius CAD4 con radiación de  $\text{Cu-K}\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ). Los datos se colectaron a 298 K en el modo de registro  $\omega$ -2 $\theta$ . Los refinamientos de la celda unitaria se hicieron usando el programa CAD4 Express v2.0. Los datos se procesaron mediante el

paquete de programas SAINT. Las estructuras se resolvieron por métodos directos usando los programas SHELXS97 incluidos en el paquete de programas cristalográfico WinGX v1.64.05. El refinamiento estructural se llevó a cabo por matrices totales de mínimos cuadrados en  $F^2$ . Los átomos, excepto hidrógenos, fueron tratados anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno, incluidos en el factor de estructura, se refinaron isotrópicamente.

La colección de datos y parámetros para procesar las estructuras de rayos-X de los espirociclopropil oxindoles *anti-2b*,<sup>25</sup> *syn-2b*,<sup>25</sup> *anti-2c*,<sup>25</sup> *anti-2d*, *anti-2e*<sup>28</sup> y *anti-2f*, del espirociclopentil oxindol *syn-3f* y de las metanacetamidas espirocíclicas *anti-5a*,<sup>25</sup> *anti-6a* y *syn-7a* se encuentran compilados en la Tabla 19 (ver Apéndice).

La colección de datos y parámetros para procesar las estructuras de rayos-X de los oxindoles **14e**, **15** y **16** se encuentran compilados en la Tabla 20 (ver Apéndice).

## 7.6 Modelado molecular

Con el objetivo de determinar las conformaciones más estables de los análogos de la MLT conformacionalmente restringidos *anti/syn* **5a**, **5b**, **6a** y **7a**, se realizó una minimización de dichos compuestos mediante una búsqueda conformacional Monte Carlo al azar, con un campo de fuerza MMFF94 utilizando el programa Spartan 04 Windows. Posteriormente, los cálculos conformacionales se optimizaron mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT, de sus siglas en inglés) a nivel B3LYP/6-31G (d) y se eliminaron las conformaciones equivalentes. La energía de activación relativa ( $\Delta E_a$ ) para los confórmeros de cada diasterómero se muestra en la Tabla 21, en tanto que la población relativa de cada confórmero se indica en la Tabla 22. En las Figuras 32-36 se muestran las proyecciones de las dos conformaciones más estables de los compuestos *anti/syn* **5a**, **5b**, **6a** y **7a** (ver Apéndice).

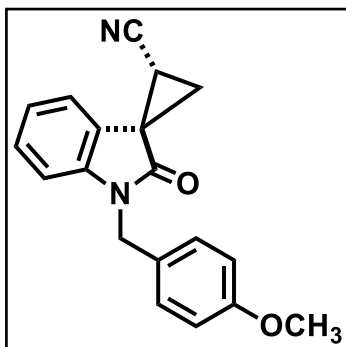


## 7.7 Procedimientos generales

### 7.7.1 Espirociclización de 3-cianometiloxindoles

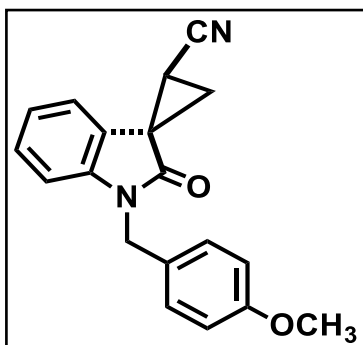
A una solución del 3-cianometiloxindol **1a-f** (200 mg) en DMF (4 mL) se le adicionó NaH (2.5 mmol) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido este tiempo se adicionó el dibromoalcano (1.3 mmol) y la mezcla resultante se mantuvo en agitación a la misma temperatura durante 5 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionó agua (5 mL) y se acidificó con una solución acuosa de HCl al 5% (1.5 mL). La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 25 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar una mezcla que contiene el par diasterómero *anti/syn* del espirocicloalquil-oxindol sustituido por un grupo nitrilo **2a-f**, **3a**, **3e**, **3f** y **4a**. Los pares *anti/syn* **2a**, **2b**, **2e**, **3a** y **4a** son conocidos.<sup>24,25,28</sup>

**(1*R*\*,2*R*\*)-1'-(4-Metoxibencil)-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*anti*-2c) y (1*R*\*,2*S*\*)-1'-(4-Metoxibencil)-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo(*syn*-2c):**



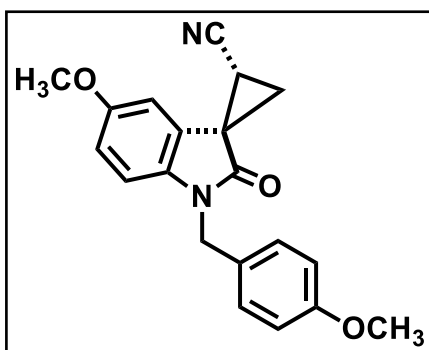
Preparado a partir de **1c**<sup>25</sup> (200 mg, 0.68 mmol) usando dibromometano como agente alquilante, obteniéndose en mezcla 3:1 con su isómero *syn*. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) (131.2 mg, 63%) para dar *anti*-**2c**<sup>25</sup> como cristales amarillos p.f. 182-183 °C (acetona/hexano), R<sub>f</sub> 0.57 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2251, 1715; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 304 [M<sup>+</sup>] (15), 265 (12), 121 (100); masa exacta: *m/z* calculada para

C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H: 305.1285; encontrada: 305.1291. Rayos-X ver Tabla 19 en Apéndice

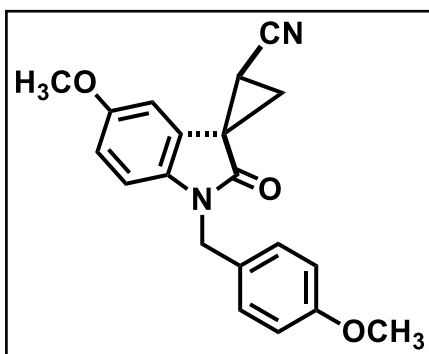


*Syn-2c*<sup>25</sup> (43.7 mg, 21%) sólido rosa pálido, p.f. 132-133 °C (acetona/hexano). *R<sub>f</sub>*: 0.38 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2252, 1717; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 304 [M<sup>+</sup>] (14), 265 (11), 121 (100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Na: 327.1104; encontrada: 327.1111.

(1*R*\*,2*R*\*)-5'-Metoxi-1'-(4-Metoxibencil)-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro [ciclopropano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*anti-2d*) y (1*R*\*,2*S*\*)-5'-Metoxi-1'-(4-metoxibencil)-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*syn-2d*):

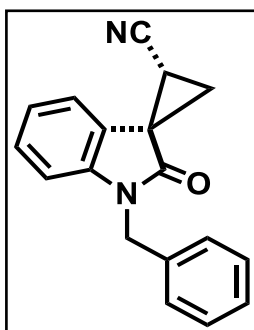


Preparado a partir de **1d** (200 mg, 0.62mmol) usando dibromometano como agente alquilante, obteniéndose en mezcla 4:3 con su isómero *syn*. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 4:1) (103 mg, 50%) para dar *anti-2d* como cristales incoloros, p.f. 154-155 °C (acetona/hexano). *R<sub>f</sub>*: 0.46 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2251, 1715; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 334 [M<sup>+</sup>] (19), 121 (100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H: 335.1395; encontrada: 335.1400. Rayos-X ver Tabla 19 en Apéndice.

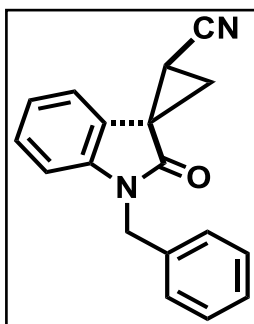


*Syn-2d* (69 mg, 33%) miel ambar.  $R_f$ : 0.26 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2251, 1715; CG-EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 334 [M<sup>+</sup>] (21), 121 (100); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H: 335.1395; encontrada: 335.1402.

**(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Bencil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*anti-2e*) y (1*R*\*,2*R*\*)-1'-Bencil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro [ciclopropano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*syn-2e*):**

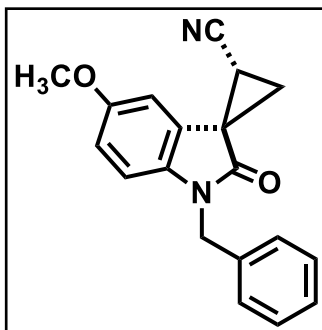


Preparado a partir de **1e<sup>62</sup>** (200 mg, 0.76 mmol) usando dibromometano como agente alquilante, obteniéndose en mezcla 3:1 con su isómero *syn*. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 4:1) (132 mg, 63%) para dar *anti-2e*<sup>28</sup> como cristales incoloros, p.f. 146-148 °C (acetona/hexano).  $R_f$ : 0.62 (hexano/AcO Et 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2250, 1715; CG-EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 274 [M<sup>+</sup>] (80), 91 (100); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O + H: 275.1184; encontrada: 275.1181. Rayos-X ver Tabla 19 en Apéndice

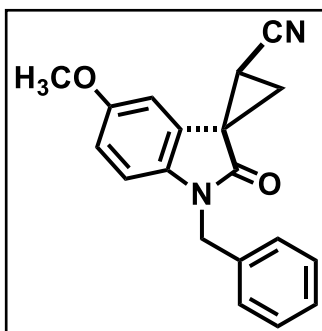


*Syn-2e*<sup>28</sup> (44 mg, 20%) miel ámbar.  $R_f$ : 0.42 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2252, 1718; CG-EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 274 [M<sup>+</sup>] (61), 91 (100); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O + Na: 297.0998; encontrada: 297.1002.

**(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Bencil-5'-metoxi-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*anti*-2f) y (1*R*\*,2*S*\*)-1'-Bencil-5'-metoxi-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*syn*-2f):**

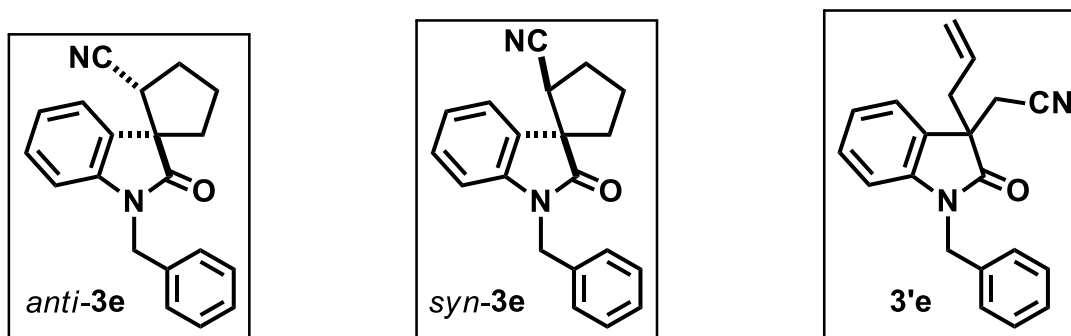


Preparado a partir de **1f**<sup>62</sup> (200 mg, 0.68 mmol) usando dibromometano como agente alquilante, obteniéndose en mezcla 3:1 con su isómero *syn*. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) (132 mg, 63%) para dar *anti*-**2f** como cristales incoloros p.f. 161-162 °C (acetona/hexano). *R<sub>f</sub>*: 0.51 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2250, 1711; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 304 [M<sup>+</sup>] (90), 91 (100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H: 305.1290; encontrada: 305.1291. Rayos-X ver Tabla 19 en Apéndice.

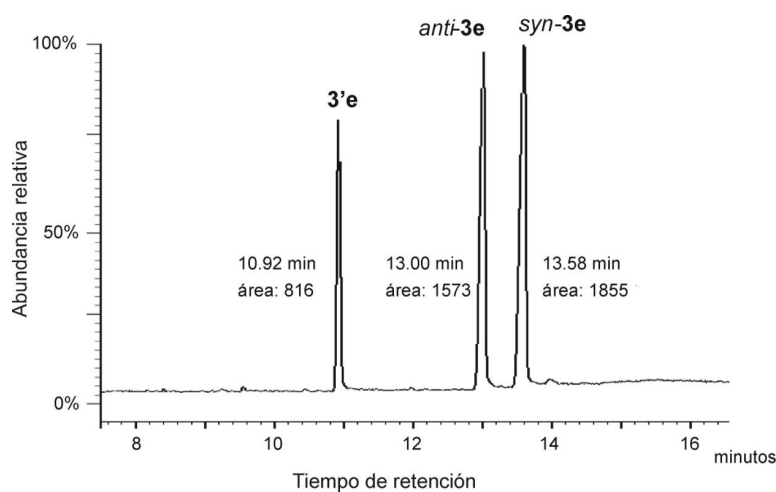


*Syn*-**2f** (47 mg, 22%) miel ámbar. *R<sub>f</sub>*: 0.31 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2251, 1716; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 304 [M<sup>+</sup>] (84), 91 (100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H: 305.1285; encontrada: 305.1289.

(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Bencil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopentano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*anti* 3e), (1*R*\*,2*S*\*)-1'-Bencil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro [ciclopentano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*syn*-3e) y [1-Bencil-2-oxo-3-(prop-2-en-1-il)-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il]acetonitrilo (3'e):



El oxindol **1e**<sup>62</sup> (200 mg, 0.76 mmol) se trató con dibromopropano durante 5 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) para dar una mezcla inseparable del par diastereomérico *anti/syn* **3e** junto con el 3-propenoxindol **3'e**, en una relación 6:7:3 como una miel ámbar. *R<sub>f</sub>*: 0.60 (hexano/AcOEt 3:2); (158 mg, 69% global).

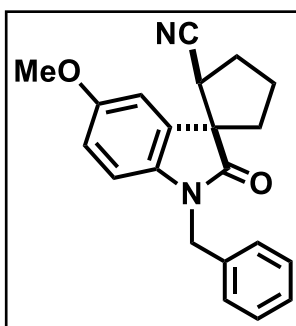


**Figura 8.** Cromatograma CG/EM de los componentes de la mezcla de espirociclos *anti/syn* **3e** y del 3-propenoxindol **3'e**.

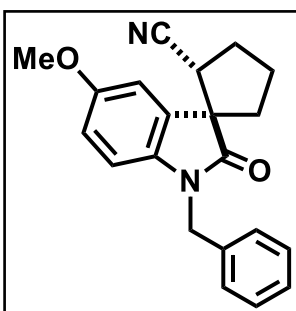
La identificación y cuantificación de cada componente se llevó al cabo por CG/EM (Figura 32). *Anti-3e*: CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 302 [M+] (100), 261 (65), 236 (34), 91 (88). *Syn-3e*: CG-EM (EI, 70 eV): *m/z* (%) 302 [M+] (100), 261(65), 236 (34), 91 (88). *3'e*: CG-EM (EI, 70 eV): *m/z* (%) 302 [M+] (56), 261 (100), 91 (76).

**(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Bencil-5'-metoxi-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopentano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*anti-3f*), (1*R*\*,2*S*\*)-1'-Bencil-5'-metoxi-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopentano-1,3'-indol]-2-carbonitrilo (*syn-3f*) y [1-Bencil-5-metoxi-2-oxo-3-(prop-2-en-1-il)-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il]acetonitrilo (*3'f*):**

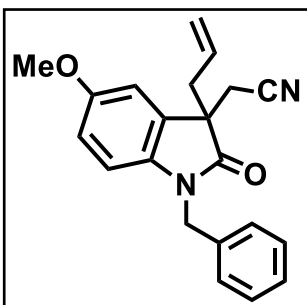
El oxindol **1f**<sup>62</sup> (200 mg, 0.68 mmol) se trató con dibromopropano durante 5 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) para dar una mezcla del par diastereomérico *anti/syn 3f* junto con el 3-propenoxindol **3'f**, en una relación 2:1:1 como una miel ámbar (162 mg, 71% global). La identificación y cuantificación de cada componente se llevó al cabo por CG/EM y por sus datos de RMN en mezcla.



De la mezcla de tres componentes *anti/syn 3f* y **3'f** se separó por cristalización de acetona/hexano el isómero *syn-3f* (40 mg, 18%) como cristales incoloros p.f. 130-131 °C. *R<sub>f</sub>*: 0.27 (AlO<sub>3</sub>, hexano/AcOEt 4:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2256, 1716; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 332 [M+] (100), 91 (59). Rayos-X ver Tabla 19 en Apéndice.



Las aguas madres se cromatografiaron usando alúmina neutra como fase estacionaria y como fase móvil hexano/AcOEt (19:1). De las fracciones colectadas (55 x 20 mL) se aisló puro *anti-3f* (fracciones 20-27) como una miel incolora. *R<sub>f</sub>*: 0.36 (AlO<sub>3</sub>, hexano/AcOEt 4:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2258, 1714; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 332 [M+] (100), 91 (59).

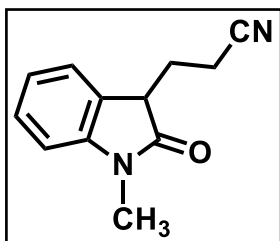


De las fracciones 34-50 se aisló puro **3'f** como una miel incolora.  $R_f$ : 0.29 (AlO<sub>3</sub>, hexano/AcOEt 4:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2267, 1721; CG-EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 332 [M<sup>+</sup>] (96), 292 (100), 91 (78).

### 7.7.2 Reducción de espirociclopropanoxindoles con Ni-Raney/THF de **2a-c**, **2e** y **2f**

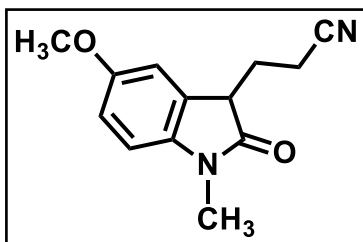
A una solución del espirociclopropan oxindol *anti*-**2a-c**<sup>24,25</sup>, **2e**,<sup>28</sup> **2f** (200 mg) en THF anhidro (8 mL) se le adicionó Ni-Raney W-5<sup>25</sup> (550 mg). La mezcla resultante fue hidrogenada en una bomba Parr a 3 atm de H<sub>2</sub> durante 5 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se filtró a través de Celita y se concentró a presión reducida hasta sequedad. El residuo fue purificado por CF para dar los propanonitril oxindoles **8a-c**, **e**, **f** junto con materia prima recuperada.

#### **3-(1-Metil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)propanonitrilo(8a):**



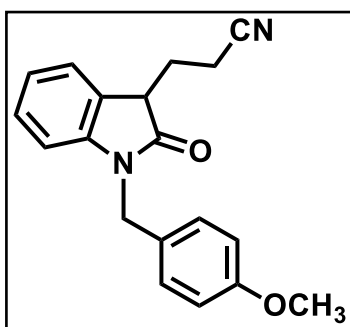
Preparado a partir de *anti*-**2a**<sup>24</sup> (200 mg, 1.0 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) (62.7 mg, 31%) para dar **8a**<sup>25</sup> como un aceite amarillo;  $R_f$ : 0.37 (hexano/AcOEt 1:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2256, 1707; CG-EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 200 [M<sup>+</sup>] (100), 160 (95), 146 (64); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>: 201.1022; encontrada: 201.1023.

### 3-(5-Metoxi-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)propanonitrilo(8b):



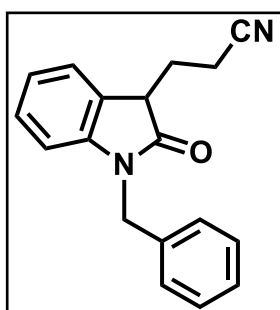
Preparado a partir de *anti-2b*<sup>25</sup> (200 mg, 0.88 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (Hexano/AcOEt 9:1) (75 mg, 37%) para dar **8b**<sup>25</sup> como cristales ligeramente amarillos; p.f. 91-93 °C (acetona/hexano); R<sub>f</sub>: 0.28 (hexano/AcOEt 1:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2256, 1699; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 230 [M<sup>+</sup>] (100), 216 (84), 177 (30); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 231.1133; encontrada: 231.1129.

### 3-[1-(4-Metoxibencil)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il]propanonitrilo (8c):



Preparado a partir de *anti-2c*<sup>25</sup> (200 mg, 0.66 mmol). El crudo de reacción fue purificado CF (hexano/AcOEt 9:1) (90 mg, 45%) para dar **8c**<sup>25</sup> como agujas incoloras; p.f. 109-110 °C (acetona/hexano); R<sub>f</sub>: 0.54 (hexano/AcOEt 1:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2253, 1704; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 306 [M<sup>+</sup>] (20), 121 (100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Na: 329.1260; encontrada: 329.1261.

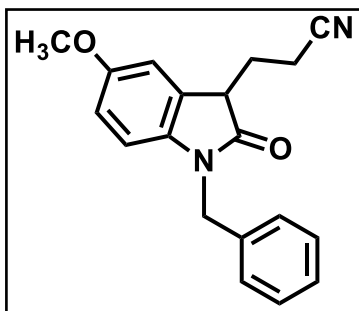
### 3-(1-Bencil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)propanonitrilo (8e):



Preparado a partir de *anti-2e*<sup>28</sup> (200 mg, 0.73 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) (58 mg, 29%) para dar **8e** como un sólido amarillo; p.f. 70-71 °C (acetona/hexano); R<sub>f</sub>: 0.6 (hexano/AcOEt 1:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2254.5, 1705.6; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 276 [M<sup>+</sup>] (100), 91 (92); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>: 277.1335; encontrada: 277.1338.



### 3-(1-Bencil-5-metoxi-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)propanonitrilo (**8f**):

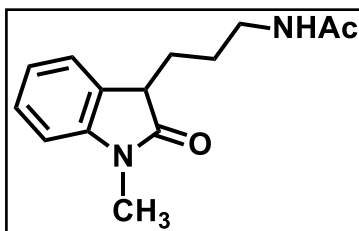


Preparado a partir de *anti*-**2f** (200 mg, 0.66 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) (58 mg, 29%) para dar **8f** como agujas finas incoloras; p.f. 106-107 °C (acetona/hexano);  $R_f$ : 0.51 (hexano/AcOEt 1:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2262, 1715; CG-EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 306 [M<sup>+</sup>] (100), 91 (70); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Na<sup>+</sup>: 329.1260; encontrada: 329.1263.

### 7.7.3 Reducción-acetilación de propanonitriloxindoles **8a-c**, **8e** y **8f**

*Procedimiento de hidrogenación catalítica en Ac<sub>2</sub>O*: A una solución del 3-propionitriloxindol **8a**<sup>25</sup> (200 mg, 1.0 mmol) en Ac<sub>2</sub>O (8 mL) se le adicionó Ni-Raney (550 mg). La mezcla resultante fue hidrogenada en una bomba Parr a 3 atm de H<sub>2</sub> (44 psi) durante 5 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla fue filtrada a través de Celita y concentrada a presión reducida a sequedad. El residuo fue disuelto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL), lavado con agua, solución saturada de NaCl, secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrado a presión reducida. El residuo fue purificado por CF para dar **9a**.<sup>25</sup>

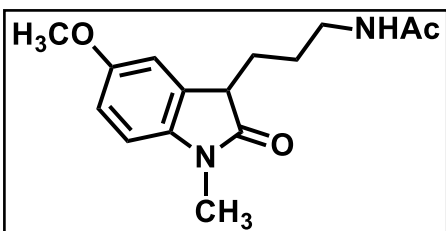
### *N*-[3-(1-Metil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)propil]acetamida (**9a**):



Preparada a partir del 3-propionitril oxindol **8a**<sup>25</sup> (200 mg, 1.0 mmol) El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (172 mg, 70%) para dar **9a**<sup>25</sup> como un sólido amarillo pálido;  $R_f$ : 0.44 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3453, 3350, 1697, 1669. CG-EM

(IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 246 [M<sup>+</sup>] (87), 188 (100), 161 (64); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 247.1446; encontrada: 247.1448.

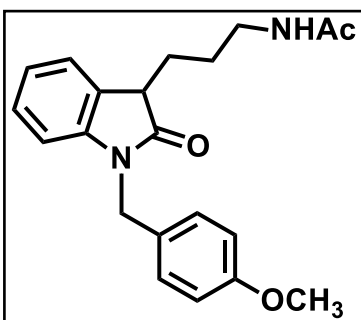
***N*-[3-(5-Metoxi-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (**9b**):**



Preparada a partir del 3-propionitril oxindol **8b**<sup>25</sup> (200 mg, 0.87 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (180 mg, 75%) para dar **9b**<sup>25</sup> como cristales amarillos; p.f. 122-125 °C (acetona/hexano); R<sub>f</sub>: 0.43

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3450, 1692. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 276 [M<sup>+</sup>] (100), 217 (83), 189 (54); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H: 277.1547; encontrada: 277.1551.

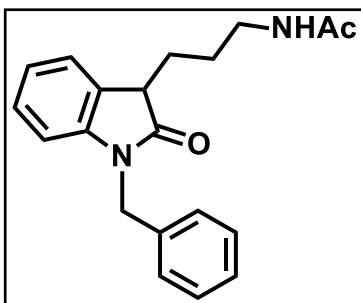
***N*-{3-[1-(4-Metoxibencil)-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il]propil}acetamida (**9c**):**



Preparada a partir del 3-propionitril oxindol **8c**<sup>25</sup> (200 mg, 0.65 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (172 mg, 75%) para dar **9c**<sup>25</sup> como un aceite ligeramente amarillo; R<sub>f</sub>: 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3451, 3366, 1700, 1669. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 352 [M<sup>+</sup>] (7), 121

(100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>: 353.1865; encontrada: 353.1859.

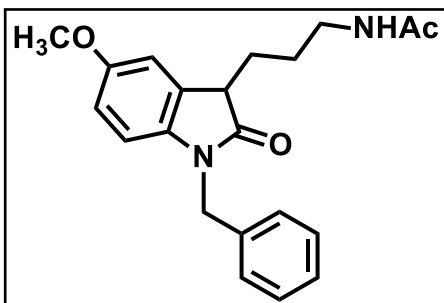
***N*-[3-(1-Bencil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (**9e**):**



Preparada a partir del 3-propionitril oxindol **8e** (200 mg, 0.72 mmol) El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (213 mg, 91%) para dar **9e** como un sólido blanco; p.f. 104-105 °C (acetona/hexano); R<sub>f</sub>: 0.47 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3459, 3362, 1710, 1677. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 322 [M<sup>+</sup>]

(100), 264 (83), 172 (53), 91 (87); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 323.1754; encontrada: 323.1749.

### ***N*-[3-(1-Bencil-5-metoxi-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (**9f**):**

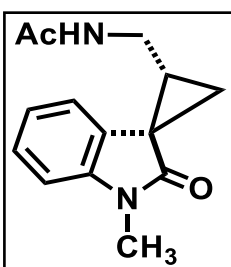


Preparado a partir del 3-propionitril oxindol **8f** (200 mg, 0.65 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (207 mg, 90%) para dar **9f** como una miel ligeramente amarilla; *R<sub>f</sub>*: 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3461, 3344, 1675, 1702. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 352 [M<sup>+</sup>] (100), 203 (60), 91 (63); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 353.1860; encontrada: 353.1856.

#### 7.7.4 Reducción-acetilación de espiroxindoles *anti*-**2a-f**

La reducción-acetilación del grupo nitrilo de los espirociclopropanoxindoles *anti*-**2a**,<sup>24</sup> *anti*-**2b**,<sup>25</sup> *anti*-**2c**,<sup>25</sup> *anti*-**2d**, *anti*-**2e**,<sup>28</sup> y *anti*-**2f** se realizó por hidrogenación catalítica con Ni-Raney en Ac<sub>2</sub>O, siguiendo a las condiciones descritas en la sección 7.6.3.

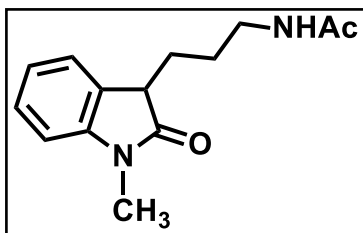
### ***N*-{[(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Metil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*anti*-**5a**) y *N*-[3-(1-Metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (**9a**):**



Preparada a partir de *anti*-**2a**<sup>24</sup> (200 mg, 0.68 mmol), obteniéndose la metanacetamida *anti*-**5a**<sup>25</sup> en mezcla con la propilacetamida **9a**<sup>25</sup> en relación 1:3. El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) recuperándose la mezcla 1:3 de *anti*-**5a** y **9a** (187 mg total, 75%) como una miel ámbar.

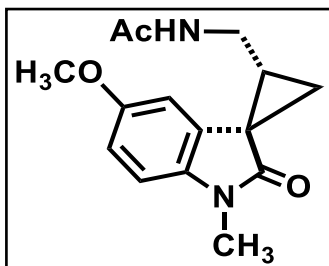
Después de que la miel permaneció varios meses en la mesa del laboratorio, se formaron cristales de *anti*-**5a** que fueron separados y lavados cuidadosamente con acetona y recristalizados de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexano; p.f. 188-189 °C. *R<sub>f</sub>*: 0.49

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3462, 3358, 1713, 1703, 1625. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 244 (M+, 100). Rayos-X ver Tabla 19 en Apéndice.



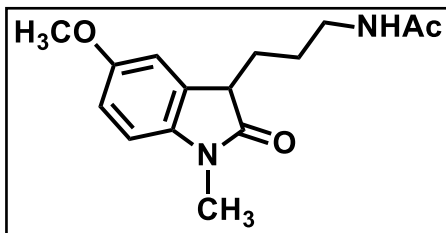
Los datos de RMN de la propilacetamida **9a** fueron consistentes con los ya descritos para el mismo compuesto preparado a partir de **8a**.

*N*-{[(1*R*\*, 2*R*\*)-5'-Metoxi-1'-metil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*anti*-**5b**) y *N*-[3-(5-Metoxi-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (**9b**):



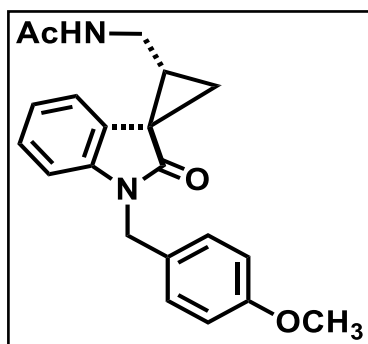
Preparada a partir de *anti*-**2b**<sup>25</sup> (200 mg, 0.88 mmol), obteniéndose *anti*-**5b**<sup>25</sup> en mezcla con **9b**<sup>25</sup> en relación 1:3. El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) recuperándose la mezcla 1:3 de *anti*-**5a** y **9a** (211 mg total, 87%) como una miel ámbar. Para *anti*-**5b**: *R<sub>f</sub>*:

0.46 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 274 (M+, 100), 216 (26), 202 (42), 174 (47).

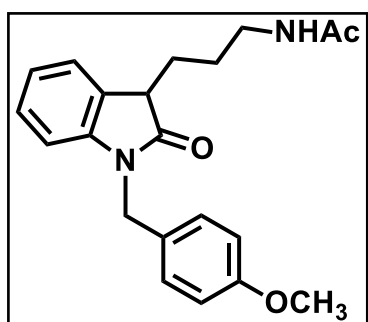


Los datos de RMN de la propilacetamida **9b** fueron consistentes con los ya descritos para el mismo compuesto preparado a partir de **8b**.

***N*-{[(1*R*\*, 2*R*\*)-1'-(4-Metoxibencil)-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*anti*-5c) y *N*-{3-[1-(4-Metoxibencil)-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il]propil}acetamida (9c):**

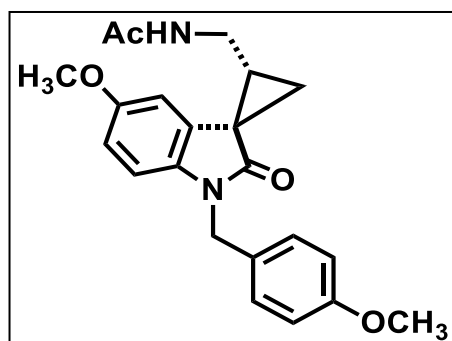


Preparada a partir de *anti*-2c<sup>25</sup> (200 mg, 0.66 mmol), obteniéndose *anti*-5c<sup>25</sup> en mezcla con 9c<sup>25</sup> en relación 1:3. El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) recuperándose la mezcla 1:3 de *anti*-5c y 9c (195 mg total, 85%) como una miel ámbar. Para *anti*-5c: R<sub>f</sub>: 0.43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 350 (M<sup>+</sup>, 19), 121 (100).

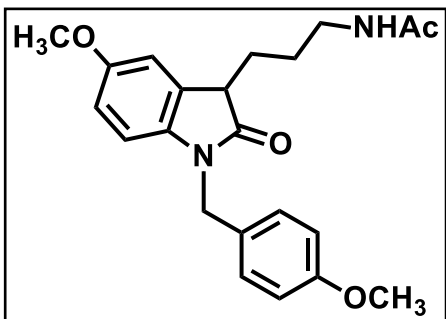


Los datos de RMN de la propilacetamida 9c fueron consistentes con los ya descritos para el mismo compuesto preparado a partir de 8c.

***N*-{[(1*R*\*,2*R*\*)-5'-Metoxi-1'-(4-metoxibencil)-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*anti*-5d) y *N*-{3-[5-Metoxi-1-(4-metoxibencil)-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il]propil}acetamida (9d):**

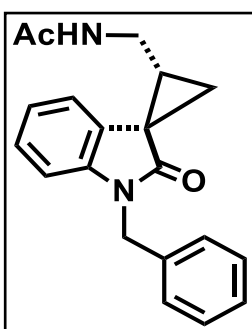


Preparada a partir de *anti*-2d (200 mg, 0.60 mmol) obteniéndose en mezcla con 9d en relación 1:3. El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) recuperándose la mezcla 1:3 de *anti*-5d y 9d (164 mg total, 72%) como miel ámbar. Para *anti*-5d: R<sub>f</sub>: 0.47 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 380 (M<sup>+</sup>, 39), 121 (100).

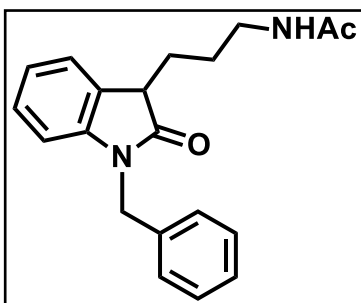


Para **9d**: R<sub>f</sub>: 0.46 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 382 (M<sup>+</sup>, 16), 121 (100). Los datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de **9d** fueron asignados en mezcla con *anti*-**5d**.

*N*-{[(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Bencil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil]acetamida (*anti*-**5e**) y *N*-[3-(1-Bencil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (**9e**):

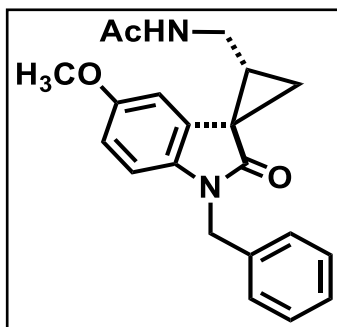


Preparada a partir de *anti*-**2e**<sup>28</sup> (200 mg, 0.73 mmol) obteniéndose *anti*-**5e** en mezcla con **9e** en relación 1:3. El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) recuperándose la mezcla 1:3 de *anti*-**5e** y **9e** (188 mg total, 80%) como una miel ámbar. Para *anti*-**5e**: R<sub>f</sub>: 0.48 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 320 (M<sup>+</sup>, 74), 262 (36), 249 (60), 235 (55), 91 (100).

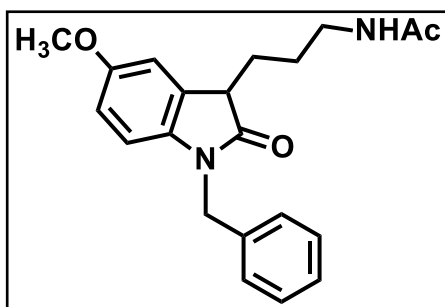


Los datos de RMN de la propilacetamida **9e** fueron consistentes con los ya descritos para el mismo compuesto preparado a partir de **8e**.

***N*-{[(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Bencil-5'-metoxi-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*anti*-5f) y *N*-[3-(1-Bencil-5-metoxi-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (9f):**



Preparada a partir de *anti*-2f (200 mg, 0.66 mmol) obteniéndose *anti*-5f en mezcla con 9f en relación 1:3. El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) recuperándose la mezcla 1:3 de *anti*-5f y 9f (208 mg total, 90%) como una miel ámbar. Para *anti*-5f: R<sub>f</sub> 0.43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); CG-EM (IE, 70 eV): m/z (%) 350 (M<sup>+</sup>, 89), 265 (100), 91 (99).

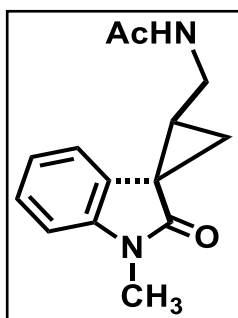


Los datos de RMN de la propilacetamida 9f fueron consistentes con los ya descritos para el mismo compuesto preparado a partir de 8f.

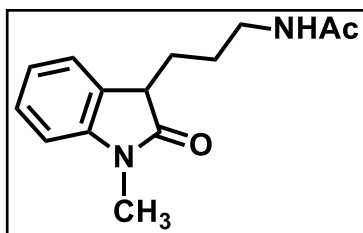
### 7.7.5 Reducción-acetilación de espiroxindoles *syn*-2a-c

La reducción-acetilación del grupo nitrilo de los espirociclopropanoxindoles *syn*-2a,<sup>24</sup> *syn*-2b<sup>25</sup> y *syn*-2c<sup>25</sup> se realizó por hidrogenación catalítica con Ni-Raney en Ac<sub>2</sub>O, siguiendo a las condiciones descritas en la sección 7.6.3.

***N*-{[(1*R*\*, 2*S*\*)-1'-Metil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*syn*-5a) y *N*-[3-(1-Metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (9a):**

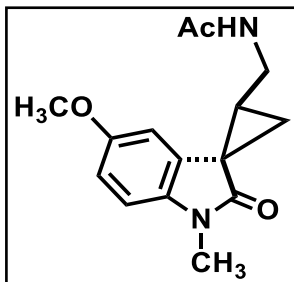


Preparada en mezcla con **9a**<sup>25</sup> a partir del espirociclopropil oxindol *syn*-**2a**<sup>24</sup> (200 mg, 1.0 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (194 mg total, 78%, o 27.5 mg de *syn* **5a**, 11%) para dar puros la metanacetamida *syn*-**5a**<sup>25</sup> y la propilacetamida **9a**<sup>25</sup> en relación 1:6. Para *syn*-**5a**: R<sub>f</sub>: 0.48 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3449, 3350, 1696, 1669; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 244 (M<sup>+</sup>,40), 159 (100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 245.1290; encontrada: 245.1283.



Los datos de RMN de la propilacetamida **9a** fueron consistentes con los ya descritos para el mismo compuesto preparado a partir de **8a**.

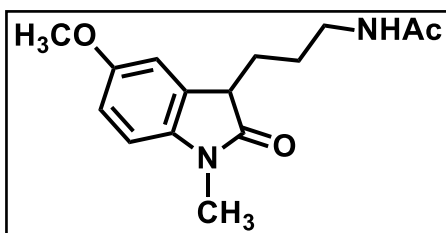
***N*-{[(1*R*\*, 2*S*\*)-5'-Metoxi-1'-metil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*syn*-5b) y *N*-[3-(5-Metoxi-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (9b):**



Preparada en mezcla con **9b**<sup>25</sup> a partir del espirociclopropil oxindol *syn*-**2b**<sup>25</sup> (200 mg, 0.88 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (203 mg total, 84%, o 29 mg de *syn* **5b**, 12%) para dar puros *syn*-**5b** y **9b** en relación 1:6. Para *syn*-**5b**: R<sub>f</sub>: 0.47 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3452, 1682; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%)

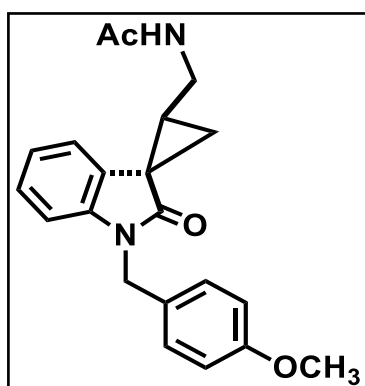
274 (M<sup>+</sup>, 100), 215 (35), 202 (75), 174 (92); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>: 275.1395; encontrada: 275.1397.



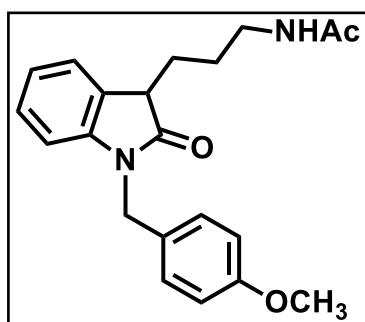


Los datos de RMN de la propilacetamida **9b** fueron consistentes con los ya descritos para el mismo compuesto preparado a partir de **8b**.

***N*-{[(1*R*\*, 2*S*\*)-1'-(4-Metoxibencil)-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopropano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*syn*-**5c**) y *N*-{3-[1-(4-Metoxibencil)-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il]propil}acetamida (**9c**):**



Preparada en mezcla con **9c**<sup>25</sup> a partir del espirociclopropil oxindol *syn*-**2c**<sup>25</sup> (200 mg, 0.66 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (207 mg total, 90%, o 29 mg de *syn* **5c**, 13%) para dar puros *syn*-**5c** y **9c** en relación 1:6. Para *syn*-**5c**: *R*<sub>f</sub>: 0.45 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3452, 3350, 1696, 1670; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 350 (M<sup>+</sup>, 8), 121 (100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+ H<sup>+</sup>: 351.1703; encontrada: 351.1709.

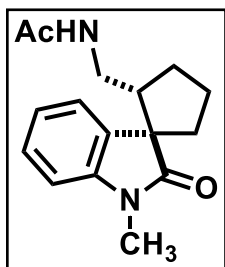


Los datos de RMN de la propilacetamida **9c** fueron consistentes con los ya descritos para el mismo compuesto preparado a partir de **8c**.

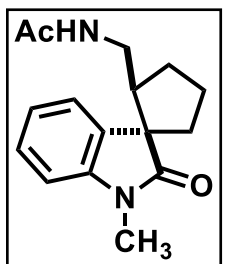
### 7.7.6 Reducción-acetilación de espirociclopentanoxindoles en mezcla *anti/syn-3a*, *anti-3f* y *syn-3f*

La reducción-acetilación del grupo nitrilo de los espirociclopentan oxindoles *anti/syn-3a* en mezcla,<sup>24</sup> *anti-3f* y *syn-3f* se realizó por hidrogenación catalítica con Ni-Raney en Ac<sub>2</sub>O, siguiendo a las condiciones descritas en la sección 7.6.3.

***N*-{[(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Metil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopentano-1,3'-indol]-2 il] metil} acetamida (*anti-6a*) y *N*-{[(1*R*\*,2*S*\*)-1'-Metil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopentano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*syn-6a*):**

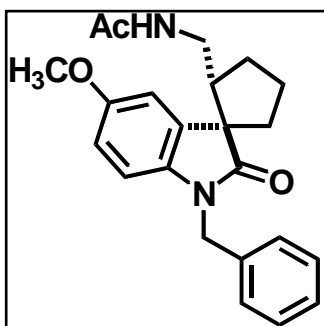


La hidrogenación catalítica de la mezcla *anti/syn-3a*<sup>24</sup> en relación 6:5 condujo a la mezcla de metanacetamidas *anti/syn-6a* en relación 6:5. El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (193 mg total, 80%). De la miel se separó por cristalización de acetona/hexano el isómero *anti-6a* (105 mg, 44%) como cristales en forma de agujas incoloras, p.f. 176-177 °C. *R<sub>f</sub>*: 0.56 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3463, 3388, 1704, 1679; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 272 (M<sup>+</sup>, 28), 198 (100), 160 (73); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 273.1598; encontrada: 273.1607. Rayos-X ver Tabla 19 en Apéndice



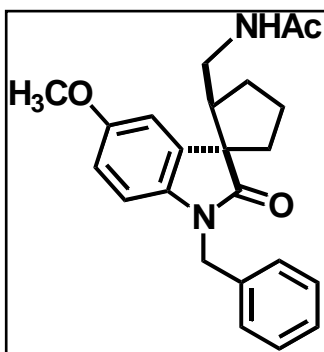
De las aguas madres se purificó por CF (AcOEt) el isómero *syn-6a* (87 mg, 36%) como un sólido blanco, p.f. 145-146 °C. *R<sub>f</sub>*: 0.60 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3464, 3400, 1708, 1680; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 272 (M<sup>+</sup>, 76), 213 (83), 161 (100); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 273.1598; encontrada: 273.1603.

***N*-{[(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Bencil-5'-metoxi-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopentano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*anti*-6f):**



Preparada a partir del espirociclopentil oxindol *anti*-3f (100 mg, 0.31 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1) (111 mg, 98%) para dar *anti*-6f como una miel incolora; *R*<sub>f</sub>: 0.27 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3448, 1701, 1690. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 378 [M<sup>+</sup>] (100), 91 (65).

***N*-{[(1*R*\*,2*S*\*)-1'-Bencil-5'-metoxi-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclopentano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*syn*-6f):**

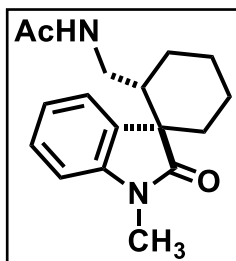


Preparada a partir del espirociclopentil oxindol *syn*-3f (200 mg, 0.62 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1) (225 mg, 99%) para dar *syn*-6f como una miel incolora; *R*<sub>f</sub>: 0.37 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3448, 1702, 1690. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 378 [M<sup>+</sup>] (100), 91 (69); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>: 379.2016; encontrada: 379.2027.

### 7.7.7 Reducción-acetilación de espirociclohexanoxindoles *anti*-4a y *syn*-4a

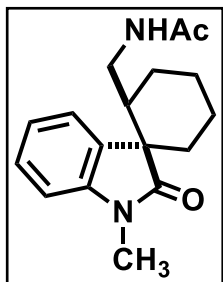
La reducción-acetilación del grupo nitrilo de los espirociclohexan oxindoles *anti*-4a<sup>24</sup> y *syn*-4a<sup>24</sup> se realizó por hidrogenación catalítica con Ni-Raney en Ac<sub>2</sub>O, siguiendo a las condiciones descritas en la sección 7.6.3

***N*-{[(1*R*\*,2*R*\*)-1'-Metil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclohexano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*anti*-7a):**



Preparada a partir del espirociclohexil oxindol *anti*-4a (200 mg, 0.83 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (204 mg, 86%) para dar *anti*-7a como un sólido ligeramente amarillo p.f. 175-176 °C (acetona/hexano); R<sub>f</sub>: 0.59 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3440, 3351, 1697, 1670. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 286 [M<sup>+</sup>] (40), 212 (100), 161 (54); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 287.1754; encontrada: 287.1757.

***N*-{[(1*R*\*,2*S*\*)-1'-Metil-2'-oxo-1',2'-dihidroespiro[ciclohexano-1,3'-indol]-2-il]metil}acetamida (*syn*-7a):**

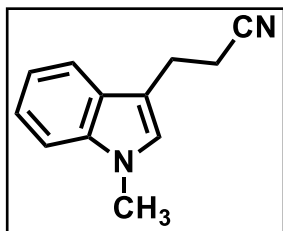


Preparada a partir del espirociclohexil oxindol *syn*-4a (200 mg, 0.83 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1) (195 mg, 82%) para dar *syn*-7a como un sólido incoloro que cristaliza en agujas finas p.f. 154-155 °C (acetona/hexano); R<sub>f</sub>: 0.60 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3452, 3361, 1696, 1670. CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) 286 [M<sup>+</sup>] (100), 160 (33); masa exacta: *m/z* calculada para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>: 287.1754; encontrada: 287.1754. Rayos-X ver Tabla 19 en Apéndice.

### 7.7.8 Síntesis de la 3-propanoacetamidaindol **11a**

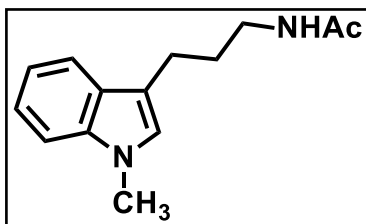
La síntesis de la 3-propanoacetamida indol **11a** se realizó en dos etapas de reacción por reducción del propanonitril oxindol **8a**<sup>25</sup> con BMS,<sup>35</sup> seguido de reducción-acetilación del grupo nitrilo por hidrogenación catalítica con Ni-Raney en Ac<sub>2</sub>O, de acuerdo a las condiciones descritas en la sección 7.6.3.

### 3-(1-Metil-1H-indol-3-il)propanonitrilo (**10a**):



A una solución del propanonitrilo **8a** (200 mg, 1.0 mmol) en THF anhidro (5 mL) se le adicionó  $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$  (200  $\mu\text{L}$ , 2.0 mmol), la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionó AcOEt (5 mL) y se acidificó con una solución acuosa de HCl al 5% (1.5 mL). La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 25 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) (92 mg, 50%) para dar **10a** como una miel ligeramente amarilla;  $R_f$ : 0.65 (hexano/AcOEt 3:2); IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2260. CG-EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 184 [ $\text{M}^+$ ] (20), 144 (100); masa exacta:  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2 + \text{H}^+$ : 185.1073; encontrada: 185.1072.

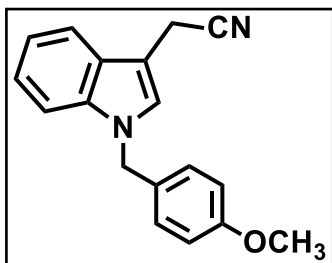
### N-[3-(1-Metil-1H-indol-3-il)propil]acetamida (**11a**):



Preparada a partir del 3-propanonitril indol **10a**, por reducción-acetilación del grupo nitrilo (200 mg, 1.08 mmol) siguiendo a las condiciones descritas en la sección 6.5.5. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 7:3) (135 mg, 54%) para dar **11a** como un sólido amarillo pálido; p.f. 70-72 °C;  $R_f$ : 0.65 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1); IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3463, 3363, 1676. CG-EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 230 [ $\text{M}^+$ ] (57), 144 (100); masa exacta:  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O} + \text{H}^+$ : 231.1492; encontrada: 231.1503.

## 7.7.9 Caracterización de sustratos iniciales, intermedios de síntesis y subproductos de reacción

### [1-(4-Metoxibencil)-1*H*-indol-3-il]acetonitrilo (**12**):

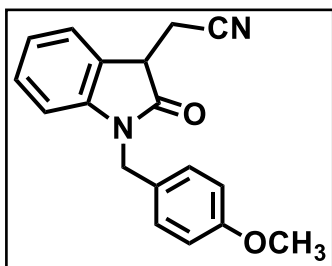


Preparado por *N*-alquilación del 3-acetonitrilindol (200 mg, 1.28 mmol) con bromuro de *p*-metoxibencilo (200 mg, 1.28 mmol). El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 4:1) (350 mg, 99%) para dar **12** como una miel amarilla;  $R_f$ : 0.65 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2255. EM (IE, 70 eV):  $m/z$  (%) 276 [M<sup>+</sup>] (24), 121 (100); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>: 277.1335; encontrada: 277.1336.

RMN de <sup>1</sup>H  $\delta$ : 7.56 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, H-7), 7.31 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, H-4), 7.22 (1H, td,  $J = 7.6, 1.4$  Hz, H-5), 7.15 (1H, td,  $J = 7.3, 1.4$  Hz, H-6), 7.09 (1H, sa, H-2), 7.06 (2H, m, H<sub>o</sub>), 6.82 (2H, m, H<sub>m</sub>), 5.18 (2H, sa, NCH<sub>2</sub>), 3.78 (2H, d,  $J = 1.09$  Hz, CH<sub>2</sub>CN), 3.76 (3H, s, OMe).

RMN de <sup>13</sup>C  $\delta$ : 159.1 (C <sub>$\rho$</sub> ), 136.5 (C-7a), 128.8 (C <sub>$i$</sub> ), 128.3 (2C <sub>$o$</sub> ), 126.6 (C-3a), 126.4 (C-2), 122.4 (C-5), 119.8 (C-6), 118.2 (C-7), 118.1 (CN), 114.1 (2C <sub>$m$</sub> ), 110.0 (C-4), 103.4 (C-3), 55.2 (OMe), 49.5 (NCH<sub>2</sub>), 14.2 (C-8).

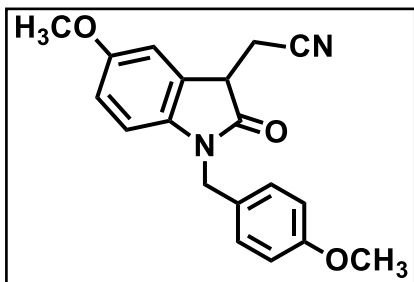
### [1-(4-Metoxibencil)-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il]acetonitrilo (**1c**):



Preparado por oxidación de [1-(4-metoxibencil)-1*H*-indol-3-il]acetonitrilo (200 mg, 0.72 mmol) con dimetilsulfóxido y HCL al 37%. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) (165 mg, 78%) para dar **1c** como un sólido rosa pálido; p.f. 139-142 °C (acetona/hexano);  $R_f$ :

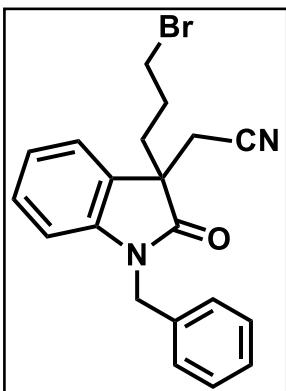
0.38 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2257, 1713. CG-EM (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 292 [M<sup>+</sup>] (13), 121 (100); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Na<sup>+</sup>: 315.1104; encontrada: 315.1104.

**[5-Metoxi-1-(4-metoxibencil)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il]acetonitrilo (1d):**



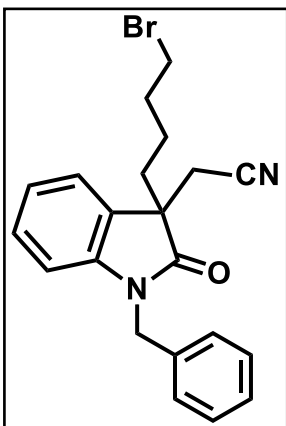
Preparado por oxidación de [5-metoxi-1-(4-metoxibencil)-1H-indol-3-il]acetonitrilo (200 mg, 0.65 mmol) con dimetilsulfóxido y HCL al 37%. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 4:1) (148 mg, 70%) para dar **1d** como un sólido rojizo; p.f. 147-150 °C (acetona/hexano);  $R_f$ : 0.28 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2266, 1720. CG-EM (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 322 [M<sup>+</sup>] (12), 121 (100).

**[1-Bencil-3-(3-bromopropil)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il]acetonitrilo (13e):**

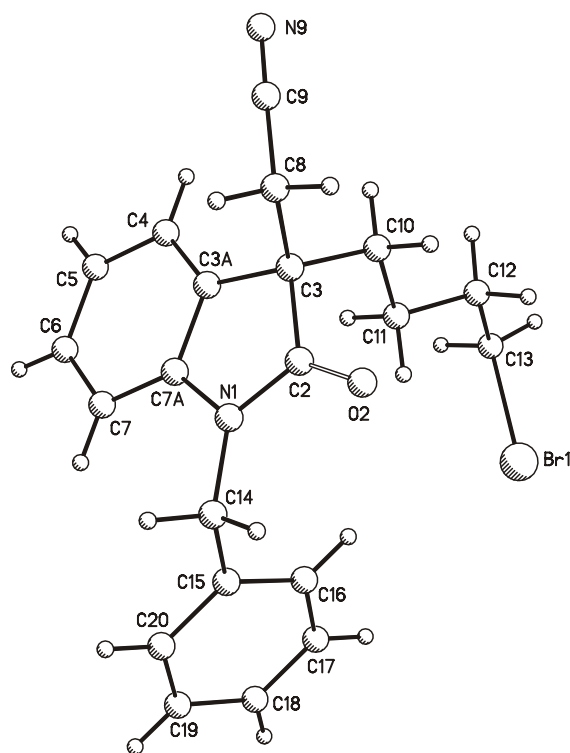


Intermediario de síntesis formado durante la alquilación de **1e** con dibromopropano. El compuesto **13e** se aisló como una miel amarilla;  $R_f$ : 0.68 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2264, 1720. CG-EM (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 382 [M<sup>+</sup>] (48), 303 (55), 225 (21), 91 (100).

**[1-Bencil-3-(4-bromobutil)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il]acetonitrilo (14e):**

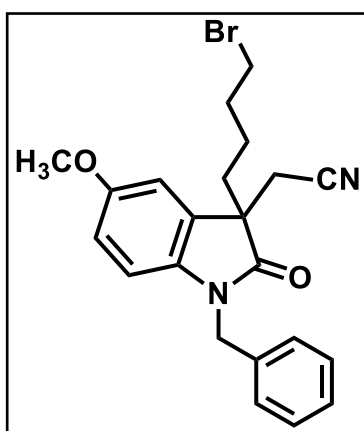


Intermediario de síntesis formado durante la alquilación de **1e** con dibromobutano. El compuesto **14e** se aisló como cristales incoloros; p.f. 137-138 °C (acetona/hexano);  $R_f$ : 0.63 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2265, 1721. CG-EM (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 396 [M<sup>+</sup>] (6), 343 (56), 262 (63), 91 (100). Rayos-X ver Tabla 20 en Apéndice



**Figura 29.** Estructura molecular del 3-acetonitriloxindol **14e** obtenida por difracción de rayos-X.

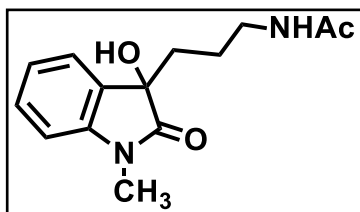
**[1-Bencil-3-(4-bromobutil)-5-metoxi-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il]acetonitrilo (14f):**



Intermediario de síntesis formado durante la alquilación de **1f** con dibromobutano. El compuesto **14f** se aisló como un sólido ámbar; p.f. 115-117 °C (acetona/hexano);  $R_f$ : 0.57 (hexano/AcOEt 3:2); IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2264, 1719. CG-EM (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 426 [ $\text{M}^+$ ] (63), 265 (27), 91 (100).



***N*-[3-(3-Hidroxi-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propil]acetamida (**15**):**

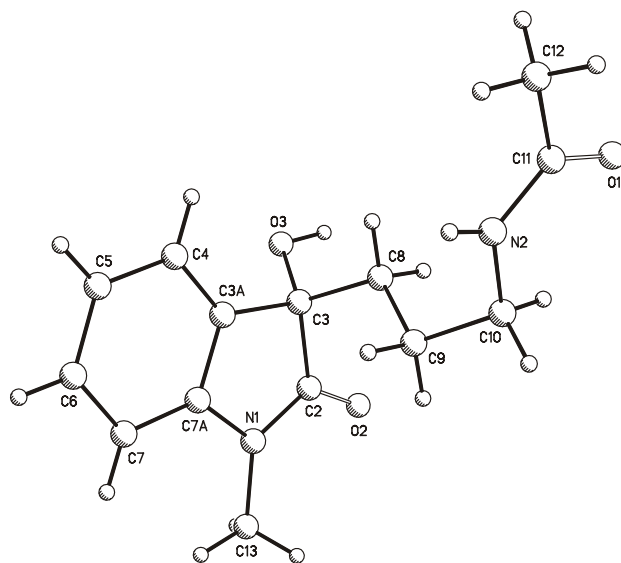


Formado por hidrogenación catalítica del 3-(3-hidroxi-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-3-il)propanonitrilo en anhídrido acético, siguiendo a las condiciones descritas en la sección 7.6.3. El compuesto **15** se aisló como un

sólido cristalino; p.f. 144-146 °C (acetona/hexano);  $R_f$ : 0.51 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3462, 3383, 1729, 1677. CG-EM (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 262 [M<sup>+</sup>] (17), 246 (100), 162 (34), 100 (25). Rayos-X ver Tabla 20 en Apéndice

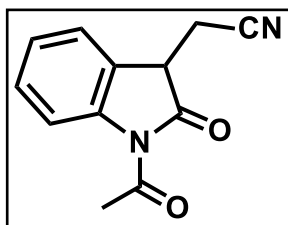
RMN de <sup>1</sup>H  $\delta$ : 7.38 (1H, da,  $J = 7.0$  Hz, H-4), 7.33 (1H, td,  $J = 7.8, 1.3$  Hz, H-6), 7.11 (1H, td,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, H-5), 6.85 (1H, da,  $J = 7.8$  Hz, H-7), 5.70 (1H, sa, NH), 3.40 (1H, sa, OH), 3.20 (2H, m, CH<sub>2</sub>-10), 3.18 (3H, s, NMe), 1.96 (2H, m, CH<sub>2</sub>-8), 1.91 (3H, s, COMe), 1.42 (2H, m, CH<sub>2</sub>-9).

RMN de <sup>13</sup>C  $\delta$ : 178.1 (C-2), 170.2 (COMe), 143.2 (C-7a), 129.9 (C-3a), 129.7 (C-6), 123.8 (C-4), 123.2 (C-5), 108.5 (C-7), 76.2 (C-3), 39.2 (C-10), 35.4 (C-8), 26.2 (NMe), 23.4 (C-9), 23.2 (COMe).



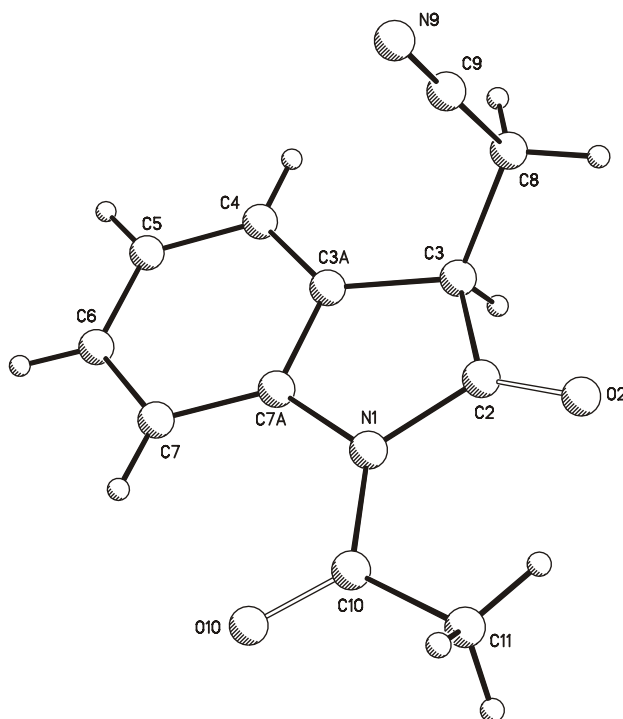
**Figura 30.** Estructura molecular de la 3-propilacetamida **15** obtenida por difracción de rayos-X.

**(1-Acetil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)acetonitrilo (16):**



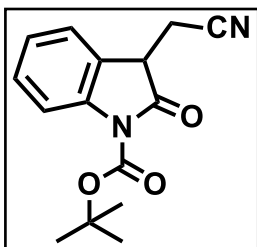
Preparado por *N*-acetilación del 3-acetonitriloxindol (200 mg, 1.16 mmol) con anhídrido acético en presencia de piridina a reflujo 2 h. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) (175 mg, 70%) para dar **16** como un sólido cristalino; p.f. 129-131 °C (acetona/hexano);  $R_f$ :

0.66 (hexano/AcOEt 3:2); IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2268, 1766, 1726. CG-EM (EI, 20 eV):  $m/z$  (%) 214 [M<sup>+</sup>] (15), 172 (100), 132 (83); masa exacta:  $m/z$  calculada para C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 214.0742; encontrada: 214.0745. Rayos-X ver Tabla 20 en Apéndice

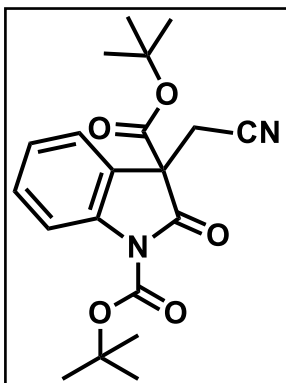


**Figura 31.** Estructura molecular del 3-acetonitriloxindol **16** obtenida por difracción de rayos-X.

***tert*-Butil 3-(cianometil)-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-1-carboxilato (**17**) y di-*tert*-Butil 3-(cianometil)-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-indol-1,3-dicarboxilato (**18**):**



La carboalcoxilación del 3-acetonitriloxindol (200 mg, 1.16 mmol) con carbonato de *tert*-butilo (668  $\mu$ L, 2.90 mmol) en presencia de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , en THF a 60  $^\circ\text{C}$  durante 4 h condujo a la mezcla de mono- y dicarboalcoxilatos **17** y **18** en relación 4:3. El crudo de reacción fue purificado por CF (hexano/AcOEt 9:1) para dar **17** (126 mg, 40%) como una miel ligeramente amarilla;  $R_f$ : 0.29 (hexano/AcOEt 3:2); IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2267, 1738. CG-EM (EI, 20 eV):  $m/z$  (%) 272 [ $\text{M}^+$ ] 172 (58), 132 (100), 115 (21); masa exacta:  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{Na}^+$ : 295.1059; encontrada: 295.1055.



El compuesto **18** (130 mg, 30%) se obtuvo como miel ligeramente amarilla  $R_f$ : 0.71 (hexano/AcOEt 3:2); IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2267, 1801, 1742. CG-EM (EI, 20 eV):  $m/z$  (%) 372 [ $\text{M}^+$ ] (2), 216 (36), 172 (52), 132 (48).

## 8. PARTE EXPERIMENTAL DE ENSAYOS DPPH Y BIOLÓGICOS

### 8.1 Materiales y métodos

Todos los reactivos químicos empleados fueron comprados a la empresa Sigma-Aldrich Chemical Co.

#### 8.1.1 Preparación de los compuestos

Cada uno de los compuestos a evaluar se disolvió en DMSO a una concentración de  $160 \times 10^{-3}$  M. Posteriormente se hicieron diluciones sucesivas con MEM suplementado con 0.5% SFB para obtener las concentraciones finales correspondientes.

#### 8.1.2 Método DPPH

Este ensayo se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano. En cada uno de los pocillos se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución metanólica de DPPH (100  $\mu$ M) seguido de 10  $\mu$ L de cada una de las diferentes concentraciones (0.01-20.0 mM) de los compuestos de prueba. Se siguió la cinética de reacción midiendo a diferentes tiempos la absorbancia del DPPH a 517 nm en un lector de microplacas espectrofotométrico Biotek El 808, hasta que la reacción llegara al equilibrio. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las concentraciones exactas de DPPH a cada uno de los tiempos medidos se calcularon por interpolación de los valores de absorbancia en la regresión lineal de la curva de calibración que se realizó con la solución de DPPH (100  $\mu$ M) previo al inicio de los ensayos.

### 8.1.2.1 Análisis de resultados

Se determinó el porcentaje de DPPH remanente (% DPPH<sub>rem</sub>) en cada punto utilizando la ecuación:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{rem}} = ([\text{DPPH}_{\tau=x}] / [\text{DPPH}_{\tau=0}]) \times 100$$

en donde  $[\text{DPPH}_{\tau=x}] / [\text{DPPH}_{\tau=0}]$  corresponden a la concentración del radical al momento de la medición y al inicio respectivamente. El porcentaje de DPPH remanente es inversamente proporcional a la actividad antioxidante. Los porcentajes de DPPH remanente se graficaron contra los tiempos a los que se realizaron las lecturas de absorbancia, a las diferentes concentraciones de los compuestos *anti/syn* **5a–7a**, **11a**, y MLT. De esta manera se calculó el tiempo necesario para que la reacción llegara al estado de equilibrio. Así mismo se realizó el análisis de regresión no lineal de las curvas dosis-respuesta para estimar la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de los compuestos *anti/syn* **5a–7a**, **11a**, y MLT cuando la cinética de reacción alcanzó el estado de equilibrio.

### 8.1.3 Cultivo Celular

En este estudio se utilizó una línea celular derivada de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Esta línea celular es adherente perpetua y se derivó de tejido hepático. Ha sido empleada para la evaluación de mecanismos de toxicidad. Las células HepG2 almacenadas en viales contenedores sumergidos en nitrógeno líquido fueron descongeladas por agitación suave en un baño de agua a 37 °C por 2 min. El contenido del vial se transfirió a una caja de Petri p-100 que contenía 10 mL de medio mínimo esencial (MME) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de piruvato de sodio, penicilina 100 unidades/mL y estreptomycin 100 µg/mL. Se incubó durante 24 h a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 100% de humedad relativa para permitir el crecimiento de las células y formar la monocapa en la caja de Petri. El medio del cultivo se cambió dos o tres veces por semana. Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia de

entre 75 a 85%, fue lavado con solución buffer de fosfato (PBS de sus siglas en inglés), tripsinizadas con 1.5 mL de 0.05% tripsina-EDTA diluido con MME recién preparado y las células fueron contadas para llevar a cabo los experimentos.

#### 8.1.4 Método MTT

Las células ( $1.2 \times 10^4$ ) se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano con volumen final de 200  $\mu$ L de MEM y se incubaron por 24 h para permitir la adhesión de las células. Posteriormente se retiró el sobrenadante cuidadosamente con vacío, se lavaron las células con PBS y se adicionaron diferentes concentraciones de los compuestos evaluados (0.1, 0.3, 1.0, 3.0 y 5.0 mM). Para los tratamientos se prepararon soluciones madre en DMSO donde el intervalo de concentración de cada compuesto de prueba permitió obtener concentraciones finales de DMSO desde 0.005 hasta 0.0001:100 v/v. Las células fueron expuestas con los compuestos y se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 100% de humedad relativa. Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición de la línea celular con las concentraciones indicadas, se añadieron 20  $\mu$ L de una solución de MTT (5 mg/mL PBS) en cada pozo y se continuó con la incubación en oscuridad. Por último se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se adicionaron 200  $\mu$ L de isopropanol/HCl (0.04 N de HCl en isopropanol) y se agitó suavemente para desarrollar el color púrpura del formazán. La densidad óptica (DO) se midió al concluir el tiempo de incubación por medio de un lector de placas Spectra Max Plus de Molecular Devices utilizando un espectrómetro de doble longitud de onda (540 nm como lectura y 720 nm como referencia) y se describe como porcentaje con respecto al control (células no tratadas). El color producido es directamente proporcional al número de células viables. Todos los ensayos se realizaron tres veces por cuadruplicado.

#### 8.1.4.1 Análisis de resultados

Los resultados se expresan como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% \text{ supervivencia} = (\text{DO de las células tratadas} / \text{DO de las células control}) \times 100$$

La curva dosis-respuesta se calculó teniendo en cuenta el intervalo de concentración utilizado y el porcentaje de reducción de crecimiento celular correspondiente. A partir de ello se estima que la concentración que produce la reducción de la viabilidad celular no mayor al 20% es no citotóxica. Las células incubadas sólo con medio de cultivo sirvieron como control representando el 100% de supervivencia. Así mismo se realizó el análisis de regresión no lineal de las curvas dosis-respuesta para estimar la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y MLT.

#### 8.1.5 Método DCFH-DA

Las células ( $1.2 \times 10^4$ ) se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  de MEM, y se incubaron por 24 h para permitir la adhesión de las células. Posteriormente se retiró el sobrenadante cuidadosamente con vacío, se lavaron las células con PBS y se adicionaron diferentes concentraciones de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a* y **11a** (50–800  $\mu\text{M}$ ), trólox y MLT (0.5–800  $\mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia de  $\text{FeCl}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ). Para los tratamientos se prepararon soluciones madre en DMSO donde el intervalo de concentraciones de cada compuesto de prueba permitió obtener concentraciones finales de DMSO desde 0.005 hasta 0.0001:100 v/v. Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  en aire y 100% de humedad relativa. Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de exposición de la línea celular con los diferentes tratamientos, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de una solución DCFH-DA (20  $\mu\text{M}$ ) en cada pozo y se continuó con la incubación en condiciones estándar en oscuridad. La intensidad de la fluorescencia se midió directamente en cada pozo

al concluir el tiempo de incubación con longitudes de onda de 480 nm de excitación y 115 nm de emisión por medio de un lector de microplacas espectrofluorométrico TECAN Infinite M200. Cada experimento se realizó tres veces por triplicado y se describe como porcentaje de fluorescencia con respecto al blanco (células no tratadas) y al control positivo (células incubadas con FeCl<sub>3</sub>).

#### 8.1.5.1 Análisis de resultados

Los resultados se expresan como porcentaje (%) de la inhibición de la oxidación de DCFH-DA, según la siguiente relación:

$$\% \text{ de inhibición de oxidación de DCFH-DA} = \frac{\text{fluorescencia de las células tratadas}}{\text{fluorescencia de las células control}} \times 100$$

La curva dosis-respuesta se calculó teniendo en cuenta el intervalo de concentración utilizado y el porcentaje de inhibición de oxidación de DCFH-DA correspondiente. Asimismo se realizó el análisis de regresión no lineal de las curvas dosis-respuesta para estimar la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de los compuestos *syn-5a*, *anti-6a*, *anti-7a*, **11a** y MLT.

#### 8.1.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de resultados se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Los datos son expresados como media  $\pm$  error estándar. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación *post hoc* de Bonferroni con el objetivo de determinar qué medias difieren significativamente con respecto al control. Se consideró que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando \* =  $p < 0.05$  (\*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ ).



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Tosini, G.; Menaker, M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* **1998**, *789*, 221-228.
2. Bubenik, G.A. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig. Dis. Sci.* **2002**, *47*, 2336-2348.
3. Slominski, A.; Tobin, D. J.; Zmijewski, M. A.; Wortsman, J.; Paus, R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends. Endocrinol Metab.* **2008**, *19*, 17-24.
4. Lardone, P. J.; Guerrero, J. M.; Fernandez-Santos, J. M.; Rubio, A.; Martin-Lacave, I.; Carrillo-Vico, A. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 454-462.
5. Altun, A.; Ugur-Atun, B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int. J. Clinic. Pract.* **2007**, *61*, 835-845.
6. Korkmaz, A.; Topal, T. Duan-Xian, T.; Russel, J. R. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2009**, *10*, 261-270.
7. Tomás-Zapico, C.; Coto-Montes, A. Melatonin as antioxidant under pathological processes. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, **2007**, *1*, 63-82.
8. Boutin, J. A.; Audinot, V.; Ferry, G.; Delagrangé, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2005**, *26*, 412-419.
9. Oviedo, J. N.; Camejo, M. I. La melatonina: ¿un posible agente terapéutico? *Interciencia*, **2001**, *26*, 103-107.
10. Garratt, P. J.; Vonhoff, S.; Rowe, S. J.; Sugden, D. Mapping the melatonin receptor. Synthesis and biological activity of indole derived melatonin analogs

with restricted conformations of the C-3 amidoethane side chain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1559-1564.

11. (a) Mathe-Allainmat, M.; Gaudy, F.; Sicsic, S.; Dangy-Caye, A. L.; Shen, S.; Bremont, B.; Benatalah, Z.; Langlois, M.; Renard, P.; Delagrangé, P. Synthesis of 2-amido-2,3-dihydro-1*H*-phenalene derivatives as new conformationally restricted ligands for melatonin receptors. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3089-3095. (b) Leclerc, V.; Depreux, P.; Lesieur, D.; Caignard, D. H.; Renard, P.; Delagrangé, P.; Guardiola-Lemaitre, B.; Morgan, P. Synthesis and biological activity of conformationally restricted tricyclic analogs of the hormone melatonin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1071-1075. (c) Spadoni, G.; Balsamini, C.; Diamantini, G.; Di Giacomo, B.; Tarzia, G.; Mor, M.; Plazzi, P. V.; Rivara, S.; Lucini, V.; Nonno, R.; Pannacci, M.; Fraschini, F.; Stankov, B. M. Conformationally restrained melatonin analogs: synthesis, binding affinity for the melatonin receptor, evaluation of the biological activity, and molecular modeling study. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1990-2002. (d) Mor, M.; Rivara, S.; Silva, C.; Bordi, F.; Plazzi, P. V.; Spadoni, G.; Diamantini, G.; Balsamini, C.; Tarzia, G.; Fraschini, F.; Lucini, V.; Nonno, R.; Stankov, B. M. Melatonin receptor ligands: synthesis of new melatonin derivatives and comprehensive comparative molecular field analysis (CoMFA) study. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3831-3844.
12. Konigsberg, F. M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. El Manual Moderno. 2008, 25-46.
13. Chan T. Y.; Tang P. L. Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. *J. Pineal. Res.* **1996**, *20*, 187-191.
14. Karbownik M.; Reiter R. J.; Qi W., Garcia J. J.; Tan D. X., Manchester L. C.; Vijayalaxmi Protective effects of melatonin against oxidation of guanine bases in DNA and decreased microsomal membrane fluidity in rat liver induced by whole body ionizing radiation. *Mol. Cell. Biochem.* **2000**, *211*, 137-144.

15. Reiter R. J.; Tan D. X.; Cabrera J.; D'Arpa D.; Sainz R. M.; Mayo J. C.; Ramos S. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol. Signals Recept.* **1999**, *8*, 56–63.
16. Bémeur, C.; Ste-Marie, L.; Montgomery, J. Increased oxidative stress during hyperglycemic, cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* **2007**, *50*, 890-904.
17. Wu, B. J.; Kathir, K.; Witting, P. K.; Beck, K.; Choy, K.; Li, C.; Croft, K. D.; Mori, T. A.; Tanous, D.; Adams, M. R.; Lau, A. K.; Stocker, R. Antioxidants protect from atherosclerosis by a heme oxygenase-1 pathway that is independent of free radical scavenging. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 1117-1127.
18. Atessahin, A.; Ceribasi, A. O.; Yilmaz, S. Lycopene, a carotenoid, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *100*, 372-376.
19. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44-84.
20. Kireev, R. A.; Tresguerres, A. C. F.; Castillo, C.; Salazar, V.; Ariznavarreta, C.; Vara, E.; Tresguerres, J. A. F. Effect of exogenous administration of melatonin and growth hormone on pro-antioxidant functions of the liver in aging male rats. *Pineal Res.* **2007**, *42*, 64-70.
21. Poeggeler, B.; Thuermann, S.; Dose, A.; Schoenke, M.; Burkhardt, S.; Hardeland, R. Melatonin's unique radical scavenging properties-roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.* **2002**, 20-30.
22. Rosen, J.; Than, N. N.; Koch, D.; Poeggeler, B.; Laatsch, H.; Hardeland, R. Interactions of melatonin and its metabolites with the ABTS cation radical: extension of the radical scavenger cascade and formation of a novel class of oxidation products, C2-substituted 3-indolinones. *J. Pineal Res.* **2006**, *41*, 374-381.

23. Mor, M.; Silva, C.; Vacondio, F.; Vicenso, P. V.; Bertoni, S.; Spadoni, G.; Diamantini, G.; Bedini, A.; Tarzia, G.; Zusso, M.; Franceschini, D.; Giusti, P. Indole-based analogs of melatonin: in vitro antioxidant and cytoprotective activities. *J. Pineal Res.* **2004**, *36*, 95-102.
24. Morales-Ríos, M. S.; González-Juárez, D. E.; Rivera-Becerril, E.; Suárez-Castillo, O. R.; Joseph-Nathan, P. One-pot synthesis of conformationally restricted spirooxindoles. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 7702-7707.
25. (a) González-Juárez, D. E.; García-Vázquez, J. B.; Zúñiga-García, V.; Trujillo-Serrato, J. J.; Suárez-Castillo, O. R.; Joseph-Nathan, P.; Morales-Ríos, M. S. Stereochemistry modulates the catalytic hydrogenolysis of nitrile-substituted cyclopropanes. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 7187-7195. (b) Zúñiga-García, V. Homologización de la cadena en una indolin-2-ona análoga de la melatonina y su evaluación como antioxidante. Tesis de Maestría. CINVESTAV IPN-Farmacología, **2008**
26. (a) Guay, D.; Beaulieu, C.; Jagadeeswar, R. T.; Zamboni, R.; Methot, N.; Rubin, J.; Ethier, D.; David, P. M. *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2009**, *19*, 5392-5396; (b) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. A. *Tetrahedron: Asymm.* **2000**, *11*, 645-763.
27. (a) Jaegli, S.; Vors, J.-P.; Neuville, L.; Zhu, J. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 8911-8921; (b) Wurz, R. P.; Lin, W.; Charette, A. B. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8845-8848; (c) Brackmann, F.; de Meijere, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4538-4583; (d) Yankee, E. W.; Spencer, B.; Howe, N. E.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4230-4237; (e) Gnad, F.; Reiser, O. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1603-1624.
28. (a) Shanmugam, P.; Vaithyanathan, V.; Viswambharan, B. Synthesis of functionalized 3-spirocyclopropane-2-indolones from isomerised Baylis-Hillman adducts of isatin, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 4342-4348; (b) Marti, C.; Carreira, E. M. Total Synthesis of (-)-Spirotryprostatin B: Synthesis and related studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11505-11515.

29. (a) Allen, F. H.; Kennard, O.; Taylor, R. Systematic analysis of structural data as a research technique in organic chemistry. *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 146-153; (b) de Boer, J. S. A. M.; Stam, C. H. The influence of substituents on the geometry of the cyclopropane ring. VI The molecular and crystal structures of cyclopropanecarboxylic acid and cyclopropanecarbonyl chloride *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1992**, *111*, 407-410.
30. Dowd, P.; Kaufman, C.; Paik, Y.-H. Protected ester, nitrile, carbinol and carbonyl amine cyclopropanone hydrates *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2283-2286.
31. (a) Sheppard, W. A. (1970) en: The chemistry of the cyano group, Rappoport, Z., (ed), Cap. 5, Wiley-Interscience, New York; (b) Hopkinson, A. C.; McKinney, M. A.; Lien, M. H. A theoretical study of  $\alpha$ -substituted isopropyl and cyclopropyl anions. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 513-523.
32. Isogai, K.; Nishizawa, N.; Saito, T.; Sakai, J.-i. Catalytic hydrogenolysis of 1,1-difluoro-2-phenyl- and 1,1-difluoro-3-methyl-2-phenylcyclopropane *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 1555-1556.
33. (a) López-Camacho, P. Y.; Joseph-Nathan, P.; Gordillo-Román, B.; Suárez-Castillo, O. R.; Morales-Ríos, M. S. Cascade [1,3]-Sigmatropic Rearrangements of Ketene O,O-Acetals: Kinetic and DFT Level Mechanistic Studies *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1898-1910; (b) Morales-Ríos, M. S.; López-Camacho, P. Y.; Jacobo-Cabral, C. O.; Pérez-Rojas, N. A.; Trujillo-Serrato, J. J.; Burgueño-Tapia, E.; Suárez-Castillo, O. R.; Joseph-Nathan, P. Unimolecular rearrangements of ketene-O,O-acetals and fragmentations occurring in the gas phase. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46*, 489-495.
34. Bettembourg, M. C.; Sege, D. Nouvelle voie d'accès à certains indoles substitués en 3. *Bull. Soc. Chim. France.* **1962**, 772-773.
35. Pfefferkorn, J. A.; Cho, C. Convenient synthesis of 1,1'-H-spiro[indoline-3,3'-piperidine]. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4372-4373.

36. Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; Mcdonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. **2002**, *127*, 183-198.
37. Magalhães, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta*. **2008**, *613*, 1-19.
38. Kedare, S. B.; Singh, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol*. **2011**, *48*, 412–422.
39. Poljšak, B.; Raspor, P. The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox *in vitro*: a comparative study. *J. Appl. Toxicol*. **2008**, *28*, 183-188.
40. Xu, J. J.; Diaz, D.; O'Brien, P. J. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chem. Biol. Interact*. **2004**, *150*, 115-128.
41. Cecchini, C.; Coman, M. M.; Cresci, A.; Tirillini, B.; Cristalli, G.; Papa, F.; Sagratini, G.; Vittoric, S.; Maggid, F. Essential oil from fruits and roots of *Ferulago campestris* (Besser) Grecescu (Apiaceae): composition and antioxidant and anti-*Candida* activity. *Flavour Frag. J*. **2010**, *25*, 493-502.
42. Prevc, Tjaš; Šegatin, N.; Poklar Ulrih, N.; Cigić, B. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, **2013**, 13-19.
43. O'Brien, P.; Haskins, J. R. In vitro cytotoxicity assessment. *Methods Mol. Biol*. **2006**, *356*, 415-425.
44. Supino, R. MTT Assays. *Methods Mol. Biol*. **1995**, *43*, 137-149.
45. Slater, T. F.; Sawyer, B.; Straüli, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, *77*, 383-393.
46. Holt, P. S.; Buckley, S.; Deloach, J. R. Detection of the lethal effects of T-2 mycotoxin on cells using a rapid colorimetric viability assay. *Toxicol. Lett*. **1987**, *39*, 301-312.
47. Sylbester, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol. Biol*. **2011**, *716*, 157-168.

48. Osseni, R. A.; Rat, P.; Bogdan, A.; Warnet, J.-M.; Touitou, Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci.* **2000**, *68*, 387-399.
49. Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. Defining hormesis. *Hum. Exp. Toxicol.* **2002**, *21*, 91-97.
50. Liu, L.; Zhu, Y.; Xu, Y.; Reiter, R. J. Melatonin delays cell proliferation by inducing G1 and G2/M phase arrest in a human osteoblastic cell line hFOB 1.19. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 222-231.
51. Carocci, A.; Catalano, A.; Bruno, C.; Lovece, A.; Roselli, M. G.; Cavalluzzi, M. M.; De Santis, F.; De Palma, A.; Rusciano, M. R.; Illario, M.; Franchini, C.; Lentini, G. N-(Phenoxyalkyl)amides as MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> ligands: Antioxidant properties and inhibition of Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinase II. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 847-851.
52. LeBel, C. P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 227-231.
53. Iron chemistry, W. R. Harris; D. M. Templeton (Ed.), *Molecular and Cellular Iron Transport*, Marcel Dekker, New York (**2002**), 1-40.
54. Vijayavel, K.; Downs, C. A.; Ostrander, G. K.; Richmond, R. H. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, **2012**, *155*, 275-280.
55. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* **1985**, *8*, 89-193.
56. Woollard, K. J.; Sturgeon, S.; Chin-Dusting, J. P. F.; Salem, H. H.; Jackson, S. P. Erythrocyte Hemolysis and Hemoglobin Oxidation Promote Ferric Chloride-induced Vascular Injury. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13110-13118.
57. Balla, J.; Vercellotti, G. M.; Jeney, V.; Yachie, A.; Varga, Z.; Eaton, J. W.; Balla, G. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 1030-1043.

58. Albertini, R.; Abuja, P. M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free. Radic. Res.* **1999**, *30*, 181-188.
59. Girard-Lalancette, K.; Pichette, A.; Legault, J. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chem.* **2009**, *115*, 720-726.
60. Cecchini, Cinzia; Coman, M. M.; Cresci, A.; Tirillini, B.; Cristalli, G; Papa, F.; Sagratini, G.; Vittoric, S.; Maggi, F. Essential oil from fruits and roots of *Ferulago campestris* (Besser) Grecescu (Apiaceae): composition and antioxidant and anti-*Candida* activity. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 493–502.
61. Wolfler, A.; Caluba, H. C.; Abuja, P. M.; Dohr, G.; Schauenstein, K.; Liebmann, P. M. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS Letters.* **2001**, *502*, 127-131.
62. Rivera-Becerril, E.; Joseph-Nathan, P.; Pérez-Álvarez, V. M.; Morales-Ríos, M. S. Synthesis and biological evaluation of (-) and (+)-debromoflustramine B and its analogues as selective butyrylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (17), 5271-5284.



## 10. APÉNDICE

	<i>Página</i>
10.1 <b>Tabla 19.</b> Datos de rayos-X de <i>anti-2b</i> , <i>syn-2b</i> , <i>anti-2c</i> , <i>anti-2d</i> , <i>anti-2e</i> , <i>anti-2f</i> , <i>syn-3f</i> , <i>anti-5a</i> , <i>anti-6a</i> y <i>syn-7a</i>	121
10.2 <b>Tabla 20.</b> Datos de rayos-X de los oxindoles <b>14e</b> , <b>15</b> y <b>16</b>	125
10.3 <b>Tabla 21.</b> Energía de activación relativa ( $\Delta E_a$ ) de los conformeros <i>anti/syn 5a</i> , <b>5b</b> , <b>6a</b> y <b>7a</b>	126
10.4 <b>Tabla 22.</b> Población de los conformeros <i>anti/syn 5a</i> , <b>5b</b> , <b>6a</b> y <b>7a</b>	127
10.5 <b>Figuras 32-36.</b> Conformaciones más estables para <i>anti/syn 5a</i> , <b>5b</b> , <b>6a</b> y <b>7a</b>	128
10.6 <b>Tablas 23-27.</b> Datos de RMN de $^1\text{H}$ de espirooxindoles <i>anti/syn 2c</i> , <b>2d</b> , <b>2e</b> , <b>2f</b> , <b>3f</b> , <b>5a</b> , <b>5b</b> , <b>5c</b> , <b>6a</b> , <b>6f</b> y <b>7a</b>	133
10.7 <b>Tabla 28.</b> Datos de RMN $^1\text{H}$ de 3-propionitril oxindoles <b>8a-c</b> , <b>8e</b> y <b>8f</b>	141
10.8 <b>Tabla 29.</b> Datos de RMN $^1\text{H}$ de 3-propilacetamidooxindoles <b>9a</b> y <b>9c-f</b>	142
10.9 <b>Tabla 30.</b> Datos de RMN $^1\text{H}$ de 3-propionitrilindol <b>10a</b> y 3-propilacetamidoindol <b>11a</b>	143
10.10 <b>Tablas 31-32.</b> Datos de RMN $^1\text{H}$ de los oxindoles <b>1c</b> , <b>1d</b> , <b>13e</b> <b>14e</b> , <b>14f</b> , <b>16</b> , <b>17</b> y <b>18</b>	144
10.11 <b>Tablas 33-37.</b> Datos de RMN de $^{13}\text{C}$ de espirooxindoles <i>anti/syn 2c</i> , <b>2d</b> , <b>2e</b> , <b>2f</b> , <b>3f</b> , <b>5a</b> , <b>5b</b> , <b>5c</b> , <b>6a</b> , <b>6f</b> y <b>7a</b>	147
10.12 <b>Tabla 38.</b> Datos de RMN $^{13}\text{C}$ de 3-propionitriloxindoles <b>8a-c</b> , <b>8e</b> y <b>8f</b>	153
10.13 <b>Tabla 39.</b> Datos de RMN $^{13}\text{C}$ de 3-propilacetamidooxindoles <b>9a</b> y <b>9c-f</b>	154

	<i>Página</i>
10.14 <b>Tabla 40.</b> Datos de RMN $^{13}\text{C}$ de 3-propionitrilindol <b>10a</b> y 3-propilacetamidoindol <b>11a</b>	155
10.15 <b>Tabla 41.</b> Datos de RMN $^1\text{H}$ de los oxindoles <b>1c</b> , <b>1d</b> , <b>13e</b> <b>14e</b> , <b>14f</b> , <b>16</b> , <b>17</b> y <b>18</b>	156
10.16 <b>Figuras 37</b> y <b>38.</b> Estructuras alineadas del fragmento C3a-C3-C $\beta$ -C $\alpha$ -N-CO de la MLT	158
10.17 <b>Figuras 39-54.</b> Espectros selectos de RMN de $^1\text{H}$	160

**Tabla 19.** Datos de los cristales y detalles relacionados con la colección y refinamiento de las estructuras obtenidas por difracción de Rayos-X de los espirociclopropil oxindoles *anti-2b*, *syn-2b*, *anti-2c*, *anti-2d*, *anti-2e* y *anti-2f*, del espirociclopropil oxindol *syn-3f* y de las metanacetamidas espirocíclicas *anti-5a*, *anti-6a* y *syn-7a*.

Compuesto	<i>anti-2b</i>	<i>syn-2b</i>	<i>anti-2c</i>
Fórmula	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>T</i> (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Dimensiones (mm)	0.40x0.32x0.32	0.40x0.22x0.20	0.36x0.32x0.30
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	C2/c	P2 <sub>1</sub> /n	P2 <sub>1</sub> /c
<i>a</i> (Å)	16.833(3)	8.464(1)	9.0587(8)
<i>b</i> (Å)	15.946(3)	10.243(1)	11.086(3)
<i>c</i> (Å)	9.020(2)	13.209(2)	15.132(3)
$\alpha$ (°)	90	90	90
$\beta$ (°)	112.21(3)	91.84(1)	92.54(4)
$\gamma$ (°)	90	90	90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	2241.5(8)	1144.7(2)	1518.1(5)
<i>D</i> <sub>calcd</sub> (mg mm <sup>-3</sup> )	1.353	1.324	1.332
<i>Z</i>	8	4	4
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.760	0.745	0.704
$\theta$ <sub>range</sub> (°)	3.97 - 59.92	5.47 - 59.95	4.89 - 60.07
Refl. totales	3715	1908	2588
Refl. únicas	1594	1694	1780
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.0001	0.0001	0.0001
Refl. observadas	1497	1499	1780
Param. refinados	159	158	213
<i>R</i> (%), <i>R</i> <sub>w</sub> (%)	5.4, 15.5	4.9, 14.1	4.6, 12.8
<i>e</i> <sub>max</sub> (eÅ <sup>-3</sup> )	0.261	0.300	0.219

**Tabla 19.** (Continúa)

Compuesto	<i>anti-2d</i>	<i>anti-2e</i>	<i>anti-2f</i>
Fórmula	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>T</i> (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Dimensiones (mm)	0.26x0.12x0.08	0.38x0.34x0.30	0.38x0.34x0.20
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico	triclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /a	C2/c	P-1
<i>a</i> (Å)	7.485(4)	16.523(3)	8.750(2)
<i>b</i> (Å)	18.998(4)	8.236(2)	8.938(1)
<i>c</i> (Å)	11.998(1)	21.849(4)	12.243(2)
$\alpha$ (°)	90	90	91.14(1)
$\beta$ (°)	94.62(3)	107.76(3)	109.12(1)
$\gamma$ (°)	90	90	116.9(2)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1700.6(9)	2831.7(0)	790.4(2)
<i>D</i> <sub>calcd</sub> (mg mm <sup>-3</sup> )	1.306	1.287	1.279
<i>Z</i>	4	8	2
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.722	0.643	0.676
$\theta$ <sub>range</sub> (°)	3.70 - 59.91	4.25 - 59.95	5.67 – 59.94
Refl. totales	2840	4448	2409
Refl. únicas	2340	2093	2284
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.0001	0.0001	0.0001
Refl. observadas	1813	1965	2139
Param. refinados	230	195	213
<i>R</i> (%), <i>R</i> <sub>w</sub> (%)	4.1, 10.6	3.4, 8.9	3.8, 11.9
$\rho$ <sub>max</sub> (eÅ <sup>-3</sup> )	0.139	0.103	0.131

**Tabla 19.** (Continúa)

Compuesto	<i>syn-3f</i>	<i>anti-5a</i>	<i>anti-6a</i>
Fórmula	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>T</i> (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Dimensiones (mm)	0.36x0.28x0.20	0.20x0.20x0.16	0.26x0.22x0.14
Sistema cristalino	monoclínico	triclínico	ortorómbico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /n	P-1	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	8.196(7)	8.813(2)	9.510(3)
<i>b</i> (Å)	24.611(7)	11.342(5)	12.090(4)
<i>c</i> (Å)	9.501(1)	13.536(4)	12.876(2)
$\alpha$ (°)	90	78.26(3)	90
$\beta$ (°)	115.43(1)	89.08(2)	90
$\gamma$ (°)	90	71.93(3)	90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1731.0(6)	1257.9(7)	1480.5(5)
<i>D</i> <sub>calcd</sub> (mg mm <sup>-3</sup> )	1.275	1.29	1.22
<i>Z</i>	4	4	4
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.660	0.707	0.650
$\theta$ <sub>range</sub> (°)	3.59 – 59.94	3.34 – 59.96	6.83 – 59.29
Refl. totales	2896	4050	1004
Refl. únicas	2172	3623	1004
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.0001	0.0001	0.0001
Refl. observadas	2172	3024	1004
Param. refinados	232	345	192
<i>R</i> (%), <i>R</i> <sub>w</sub> (%)	7.1, 21.9	6.7, 22.5	4.7, 11.3
$\rho$ <sub>max</sub> (eÅ <sup>-3</sup> )	0.309	0.284	0.118

**Tabla 19.** (Continúa)

Compuesto	<i>syn-7a</i> <sup>a</sup>
Fórmula	C <sub>34</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
<i>T</i> (K)	293(2)
Dimensiones (mm)	0.30x0.30x0.28
Sistema cristalino	tetragonal
Grupo espacial	I-4
<i>a</i> (Å)	18.483(3)
<i>b</i> (Å)	18.483(3)
<i>c</i> (Å)	9.113(2)
$\alpha$ (°)	90
$\beta$ (°)	90
$\gamma$ (°)	90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	3113.2(9)
<i>D</i> <sub>calcd</sub> (mg mm <sup>-3</sup> )	1.22
<i>Z</i>	4
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.642
$\theta$ <sub>range</sub> (°)	3.38 – 59.94
Refl totales	4923
Refl. únicas	2302
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.0466
Refl. observadas	2254
Param. refinados	201
<i>R</i> (%), <i>R</i> <sub>w</sub> (%)	2.9, 7.4
$\rho$ <sub>max</sub> (eÅ <sup>-3</sup> )	0.119

<sup>a</sup> La unidad asimétrica contiene dos moléculas unidas por un puente de hidrógeno tipo N····H, relacionado por un centro de simetría.

**Tabla 20.** Datos de los cristales y detalles relacionados con la colección y refinamiento de las estructuras obtenidas por difracción de rayos-X de los oxindoles **14e**, **15** y **16**.<sup>a</sup>

Compuesto	<b>14e</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
Fórmula	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> OBr	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>T</i> (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Dimensiones (mm)	0.40x0.40x0.38	0.22x0.22x0.12	0.30x0.30x0.15
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico	ortorómbico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /c	P2 <sub>1</sub> /n	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	9.075(2)	8.133(4)	7.189(5)
<i>b</i> (Å)	9.437(3)	20.423(1)	9.276(2)
<i>c</i> (Å)	21.981(5)	8.985(3)	15.586(2)
$\alpha$ (°)	90	90	90
$\beta$ (°)	91.54	111.23(2)	90
$\gamma$ (°)	90	90	90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1881.7(8)	1391.1	1038.3(2)
<i>D</i> <sub>calcd</sub> (mg mm <sup>-3</sup> )	1.402	1.252	1.24
<i>Z</i>	4	4	4
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	3.051	0.727	0.717
$\theta$ <sub>range</sub> (°)	4.02 – 59.95	4.33 – 59.91	5.68 – 59.87
Refl. totales	3166	2353	816
Refl. únicas	2778	2036	776
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.0001	0.0001	0.0001
Refl. observadas	2655	1549	754
Param. refinados	227	180	149
<i>R</i> (%), <i>R</i> <sub>w</sub> (%)	4.2, 9.7	4.5, 12.1	3.2, 9.1
$\sigma$ <sub>max</sub> (eÅ <sup>-3</sup> )	0.549	0.240	0.173

<sup>a</sup> Ver Sección 7.6.9 en Experimental

**Tabla 21.** Energía de activación<sup>a</sup> relativa ( $\Delta E_a$ ) para los conformeros *anti/syn* **5a**, **5b**, **6a** y **7a**.

Conf.	<b>5a</b>		<b>5b</b>		<b>6a</b>		<b>7a</b>	
	<i>anti</i>	<i>syn</i>	<i>anti</i>	<i>syn</i>	<i>anti</i>	<i>syn</i>	<i>anti</i>	<i>syn</i>
1	0.000 <sup>b</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>g</sup>	0.00 <sup>h</sup>	0.000 <sup>i</sup>
2	0.649	0.875	0.543	0.300	0.765	1.637	0.555	0.216
3	1.495	2.093	1.104	0.951	1.097	1.731	0.800	0.554
4	1.867	3.523	1.185	1.038	1.104	2.037	1.048	0.599
5	–	3.996	2.447	2.333	1.993	2.671	1.682	1.150
6	–	–	–	2.388	–	2.749	2.051	4.110
7	–	–	–	2.653	–	3.005	3.493	4.916
8	–	–	–	3.662	–	3.041	4.090	–
9	–	–	–	4.000	–	4.369	4.201	–
10	–	–	–	4.231	–	4.445	4.740	–
11	–	–	–	4.770	–	5.353	5.612	–
12	–	–	–	–	–	–	6.720	–

<sup>a</sup>  $E_a$  para el mínimo global calculado a nivel DFT B3LYP/6-31G (d).

<sup>b</sup> $E_a$  = –503951.217 kcal/mol.

<sup>c</sup> $E_a$  = –503952.900 kcal/mol.

<sup>d</sup> $E_a$  = –575814.668 kcal/mol.

<sup>e</sup> $E_a$  = –575815.918 kcal/mol.

<sup>f</sup> $E_a$  = –553305.470 kcal/mol.

<sup>g</sup> $E_a$  = –553306.900 kcal/mol.

<sup>h</sup> $E_a$  = –577978.874 kcal/mol.

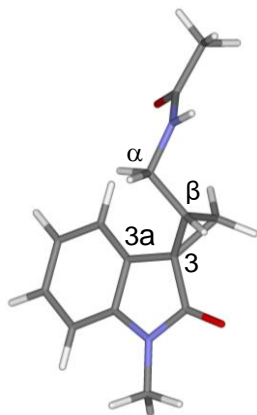
<sup>i</sup> $E_a$  = –577978.564 kcal/mol.



**Tabla 22.** Población reactiva(%)<sup>a</sup> para los conformeros *anti/syn* **5a**, **5b**, **6a** y **7a**.

Conf.	<b>5a</b>		<b>5b</b>		<b>6a</b>		<b>7a</b>	
	<i>anti</i>	<i>syn</i>	<i>anti</i>	<i>syn</i>	<i>anti</i>	<i>syn</i>	<i>anti</i>	<i>syn</i>
1	68.615	72.289	58.605	49.263	61.633	84.520	52.150	38.526
2	22.940	18.093	23.429	29.692	16.971	5.328	20.464	26.756
3	5.507	2.318	9.094	9.890	9.692	4.552	13.535	15.115
4	2.939	0.207	7.928	8.544	9.570	2.713	8.901	14.027
5	–	0.093	0.943	0.961	2.135	0.931	3.051	5.530
6	–	–	–	0.876	–	0.817	1.637	0.037
7	–	–	–	0.560	–	0.530	0.144	0.010
8	–	–	–	0.102	–	0.499	0.052	–
9	–	–	–	0.058	–	0.053	0.044	–
10	–	–	–	0.039	–	0.047	0.018	–
11	–	–	–	0.016	–	0.010	0.004	–
12	–	–	–	–	–	–	0.001	–

<sup>a</sup>Obtenida de los valores de  $\Delta E_a$  a 298 K y 1 atm usando la ecuación de Boltzmann.



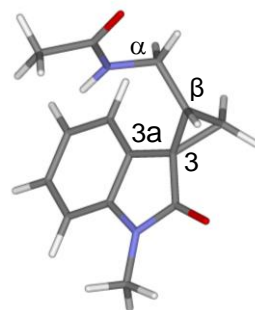
**C<sub>1</sub> anti-5a**

$$n = 0.6862$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = -0.36^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = -132.79^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 92.70^\circ$$



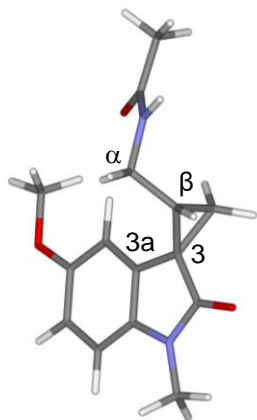
**C<sub>2</sub> anti-5a**

$$n = 0.2295$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = -3.29^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 71.51^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 116.22^\circ$$



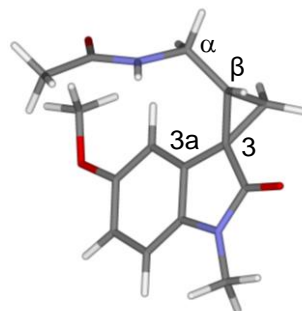
**C<sub>1</sub> anti-5b**

$$n = 0.5860$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 0.07^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = -128.49^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 97.16^\circ$$



**C<sub>2</sub> anti-5b**

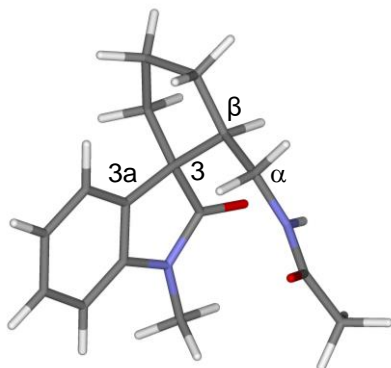
$$n = 0.2342$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = -4.95^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 71.07^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = -132.61^\circ$$

**Figura 32.** Conformaciones más estables C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> para *anti-5a* y *anti-5b* (Tablas 21 y 22).



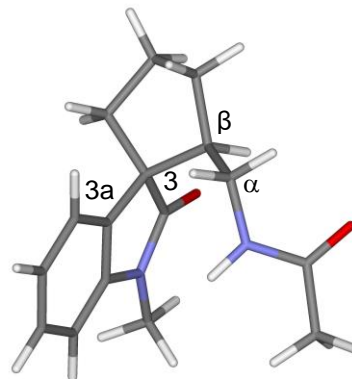
**C<sub>1</sub> anti-6a**

$$n = 0.6163$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 44.07^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 64.34^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = -163.72^\circ$$



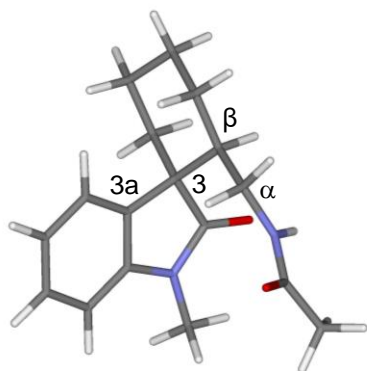
**C<sub>2</sub> anti-6a**

$$n = 0.1697$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 9.07^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 61.79^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 89.47^\circ$$



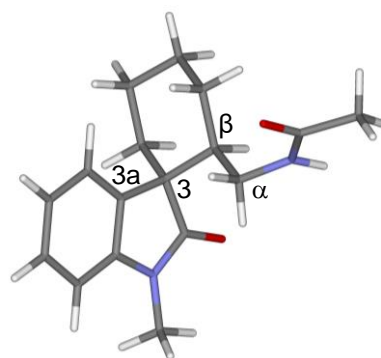
**C<sub>1</sub> anti-7a**

$$n = 0.5214$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 48.82^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 62.55^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = -160.58^\circ$$



**C<sub>2</sub> anti-7a**

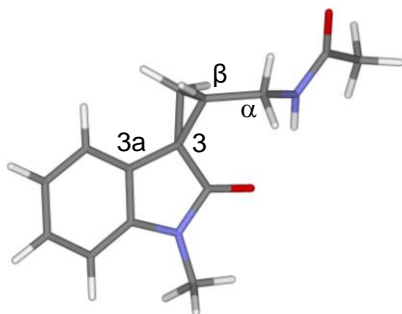
$$n = 0.2046$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 48.87^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 167.28^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 111.39^\circ$$

**Figura 33.** Conformaciones más estables C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> para *anti-6a* y *anti-7a* (Tablas 21 y 22).



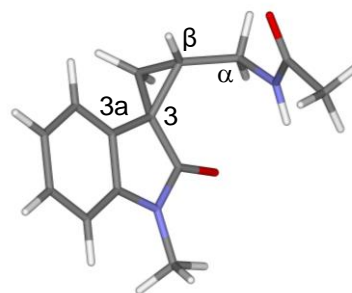
**C<sub>1</sub> *syn*-5a**

$$n = 0.7928$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 136.22^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 60.02^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 117.52^\circ$$



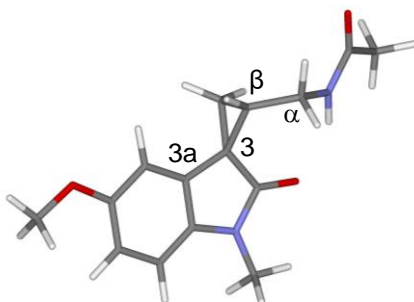
**C<sub>2</sub> *syn*-5a**

$$n = 0.1809$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 138.64^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = -68.46^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = -74.30^\circ$$



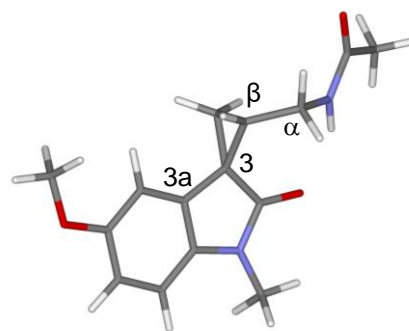
**C<sub>1</sub> *syn*-5b**

$$n = 0.4926$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 136.90^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 58.93^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 114.64^\circ$$



**C<sub>2</sub> *syn*-5b**

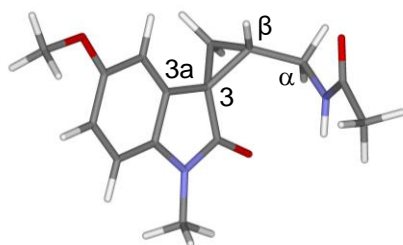
$$n = 0.2969$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 136.74^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 59.95^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 113.02^\circ$$

**Figura 34.** Conformaciones más estables C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> para *syn*-5a y *syn*-5b (Tablas 21 y 22).



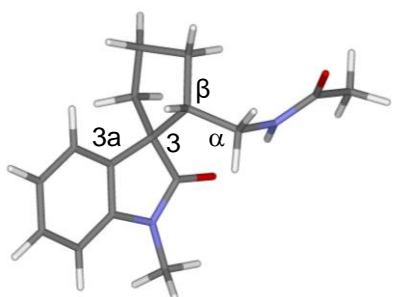
**C<sub>3</sub> *syn*-5b**

$$n = 0.0988$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 139.32^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = -68.52^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = -75.84^\circ$$



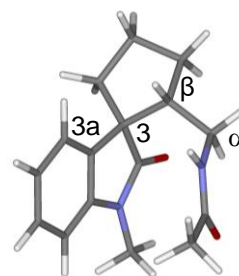
**C<sub>1</sub> *syn*-6a**

$$n = 0.8451$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 105.61^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 75.76^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 114.75^\circ$$



**C<sub>2</sub> *syn*-6a**

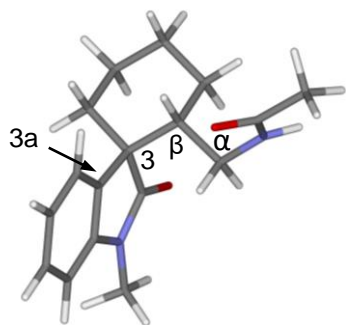
$$n = 0.0532$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 76.58^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = -71.37^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 121.82^\circ$$

**Figura 35.** Conformaciones más estables: C<sub>3</sub> para *syn*-5b; C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> para *syn*-6a (Tablas 21 y 22).



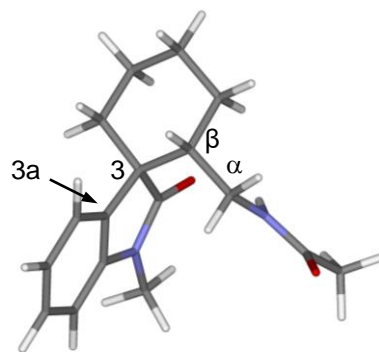
**C<sub>1</sub> *syn-7a***

$$n = 0.3852$$

$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 58.33^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = -169.94^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 80.19^\circ$$



**C<sub>2</sub> *syn-7a***

$$n = 0.2675$$

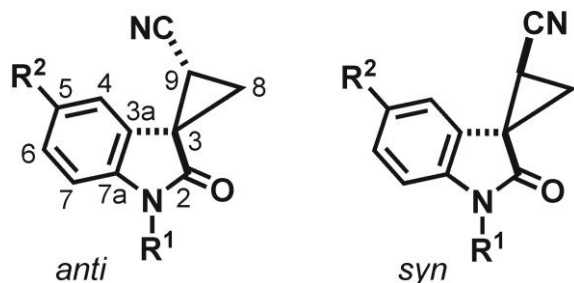
$$\angle (\text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha) = 56.71^\circ$$

$$\angle (\text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}) = 71.14^\circ$$

$$\angle (\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}) = 175.80^\circ$$

**Figura 36.** Conformaciones más estables C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> para *syn-7a* (Tablas 21 y 22).

**Tabla 23.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los espirociclopropiloxindoles *anti/syn-2c-f* en  $\text{CDCl}_3$ .<sup>a,b</sup>



	<b>2c</b>	<b>2d</b>	<b>2e</b>	<b>2f</b>
R <sup>1</sup>	<i>p</i> -OMeBn	<i>p</i> -OMeBn	Bn	Bn
R <sup>2</sup>	H	OMe	H	OMe

		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8 <sub>anti</sub>	H-8 <sub>syn</sub>	H-9 <sub>anti</sub>	H-9 <sub>syn</sub>
<b>anti-2c</b>	$\delta$	7.20 ddd	7.28 td	7.10 td	6.90 dd	1.92 dd	2.18 dd	-	2.51dd
	$J$	7.6, 1.3, 0.6	7.6, 1.3	7.6, 1.0	7.8, 1.0	7.0, 5.0	9.5, 5.0	-	9.5, 7.0
<b>syn-2c</b>	$\delta$	6.81 da	7.23 td	7.01 td	6.87 br d	2.01 dd	2.22 dd	2.35 dd	-
	$J$	7.7	7.7, 1.2	7.7, 0.9	7.7	9.2, 5.0	7.4, 5.0	9.2, 7.4	-
<b>anti-2d</b>	$\delta$	6.80 d	-	6.79 d	6.78 d	1.88 dd	2.17 dd		2.50 dd
	$J$	1.9	-	5.0	5.0	6.9, 5.0	9.5, 5.0		9.5, 6.9
<b>syn-2d</b>	$\delta$	6.42	-	6.73	6.74	1.97 dd	2.19 dd	2.32 dd	-
	$J$	- <sup>c</sup>	-	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	9.4, 5.3	7.6, 5.3	9.4, 7.6	-
<b>anti-2e</b>	$\delta$	7.21 dd	7.10 td	7.27 dd	6.86 da	1.92 dd	2.18 dd	-	2.50 dd
	$J$	7.3, 1.3	7.6, 0.9	7.6, 1.3	7.8	6.9, 4.9	9.5, 4.9	-	9.4, 6.9

**Tabla 23.** (Continúa)

		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8 <sub>anti</sub>	H-8 <sub>syn</sub>	H-9 <sub>anti</sub>	H-9 <sub>syn</sub>
<i>syn-2e</i>	$\delta$	6.83 dd	7.01 td	7.21 dd	6.84 dd	2.02 dd	2.23 dd	2.36 dd	-
	$J$	7.1, 1.4	7.7, 0.8	7.8, 1.4	8.0	9.3, 4.9	7.4, 4.9	9.3, 7.4	-
<i>anti-2f</i>	$\delta$	6.81 dd	-	6.78 dd	6.74 d	1.91 dd	2.19 dd	-	2.52 dd
	$J$	2.2, 1.0	-	4.4, 2.3	8.2, 1.0	7.0, 4.9	9.5, 4.9	-	9.5, 6.9
<i>syn-2f</i>	$\delta$	6.45 ta	-	6.71 d	6.71 d	2.0 dd	2.19 dd	2.37 dd	-
	$J$	1.4	-	1.4	1.4	9.2, 5.1,	7.3, 5.1	9.0, 7.4	-

<sup>a</sup> *anti/syn-2a* ver Ref. 24; *anti/syn-2b* ver Ref. 25. <sup>b</sup> *Anti* ó *syn* con respecto al grupo carbonilo en C2. <sup>c</sup> El sistema no es de primer orden.

*anti-2c*:  $\delta$  7.25 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.85 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.94 y 4.88 (AB, 2H,  $J$  = 14.7 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OMe)

*syn-2c*:  $\delta$  7.29 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.85 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.98 y 4.90 (AB, 2H,  $J$  = 15.3 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.76 (s, 3H, OMe)

*anti-2d*:  $\delta$  7.25 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.87 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.88 (AB, 2H,  $J$  = 16.2 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H OMe), 3.76 (s, 3H, OMe)

*syn-2d*:  $\delta$  7.26 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.85 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.93 y 4.86 (AB, 2H,  $J$  = 15.8 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.73 (s, 3H, OMe)

*anti-2e*:  $\delta$  7.32 (m, 2H<sub>o</sub>); 7.32 (m, 2H<sub>m</sub>), 7.33 (m, H<sub>p</sub>), 5.00 y 4.94 (AB, 2H,  $J$  = 16.8 Hz, NCH<sub>2</sub>)

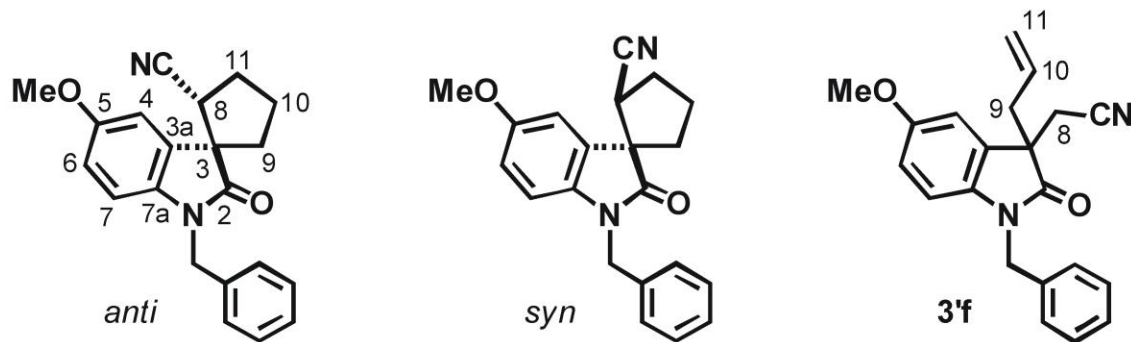
*syn-2e*:  $\delta$  7.35 (m, 2H<sub>o</sub>), 7.35 (m, H<sub>p</sub>), 7.28 (m, 2H<sub>m</sub>), 5.04 y 4.96 (AB, 2H,  $J$  = 15.5 Hz, NCH<sub>2</sub>)

*anti-2f*:  $\delta$  7.33 (m, H<sub>p</sub>), 7.30 (m, 2H<sub>o</sub>), 7.29 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.95 (AB, 2H,  $J$  = 16.4 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OMe)

*syn-2f*:  $\delta$  7.31 (m, 2H<sub>o</sub>), 7.29 (m, H<sub>p</sub>), 7.24 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.95 y 4.90 (AB, 2H,  $J$  = 15.6 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.70 (s, 3H, OMe)



**Tabla 24.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los espirociclopentiloxindoles *anti/syn-3f* y de **3'f** en  $\text{CDCl}_3$ .



		H-4	H-6	H-7	H-8 <sub>anti</sub>	H-8 <sub>syn</sub>	H-9 <sub>anti</sub>	H-9 <sub>syn</sub>	H-10 <sub>anti</sub>	H-10 <sub>syn</sub>	H-11 <sub>anti</sub>	H-11 <sub>syn</sub>
<i>anti-3f</i>	$\delta$	6.95 d	6.73 dd	6.64 d	-	3.39 dd	2.03	2.34	2.18	2.18	2.31	2.61
	$J$	2.3	8.2, 2.3	8.2	-	9.4, 8.2	m	m	m	m	m	m
<i>syn-3f</i>	$\delta$	6.78 d	6.68 dd	6.59 d	3.08 dd	-	2.06	2.34	2.03*	2.35*	2.64	2.41
	$J$	2.5	8.5, 2.5	8.5	11.3, 7.9	-	m	m	m	m	m	m
<b>3'f</b>	$\delta$	7.05 d	6.74 dd	6.64 d	2.91, 2.7		2.72		5.43		5.03 dm	5.13 dm
	$J$	2.3	8.2, 2.3	8.8	AB, 16.4		m		m		17.0	10.0

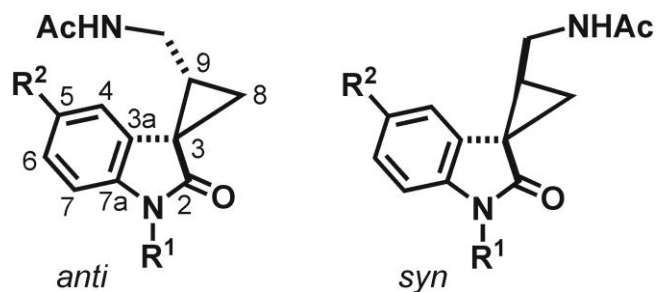
\*Señales intercambiables.

*anti-3f*:  $\delta$  7.27 (m, 2H<sub>o</sub>, H <sub>$\rho$</sub> ); 7.32 (m, 2H <sub>$m$</sub> ); 4.95 y 4.89 (AB, 2H,  $J$  = 15.8 Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.77 (s, 3H, OMe).

*syn-3f*:  $\delta$  7.36 (m, 2H<sub>o</sub>); 7.32 (m, H <sub>$\rho$</sub> ); 7.26 (m, 2H <sub>$m$</sub> ); 5.08 y 4.79 (AB, 2H,  $J$  = 15.7 Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.77 (s, 3H, OMe).

**3'f**:  $\delta$  7.35-7.15 (m, 5H, 2H<sub>o</sub>, 2H <sub>$m$</sub> , H <sub>$\rho$</sub> ); 4.98 y 4.81 (AB, 2H,  $J$  = 15.8 Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.78 (s, 3H, OMe).

**Tabla 25.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  de los espirociclopropiloxindoles *anti/syn-5a*, *anti/syn-5b* y *anti/syn-5c* en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>5a</b>	<b>5b</b>	<b>5c</b>
R <sup>1</sup>	Me	Me	<i>p</i> -OMeBn
R <sup>2</sup>	H	OMe	H

		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8 <sub>anti</sub>	H-8 <sub>syn</sub>	H-9 <sub>anti</sub>	H-9 <sub>syn</sub>	H-10
<i>anti-5a</i> <sup>a</sup>	$\delta$	7.09 dd	7.05 td	7.30 td	6.93 da	1.91	1.52	-	2.12	3.97, 3.22
	<i>J</i>	6.7, 1.9	7.6, 1.0	7.3, 1.9	7.6	m	m	-	m	m
<i>syn-5a</i>	$\delta$	6.81 d	7.05 ta	7.26 td	6.91 da	1.72 dd	1.78 dd	2.34	-	3.80
	<i>J</i>	7.0	7.6	7.6, 1.2	7.0	8.2, 4.7	8.2, 4.7	m	-	m
<i>anti-5b</i> <sup>a</sup>	$\delta$	<i>-b</i>	-	<i>-b</i>	<i>-b</i>	3.97	<i>-b</i>	-	2.14	<i>-b</i>
	<i>J</i>	-	-	-	-	m	-	-	m	-
<i>syn-5b</i>	$\delta$	6.41 dd	-	6.79 dd	6.80 da	1.69 dd	1.78 dd	2.31		3.81
	<i>J</i>	1.9, 1.0	-	8.1, 1.9	8.1, 1.0	7.9, 4.7	8.9, 4.7	m		m

**Tabla 25.** (Continúa)

		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8 <sub>anti</sub>	H-8 <sub>syn</sub>	H-9 <sub>anti</sub>	H-9 <sub>syn</sub>	H-10
<i>anti-5c</i> <sup>a</sup>	$\delta$	7.08 da	7.01 ta	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	1.95	1.55	-	2.18	3.92, 3.24
	<i>J</i>	8.0	8.1	-	-	m	m	-	m	m
<i>syn-5c</i>	$\delta$	6.80 ddd	7.00 td	7.16 td	6.83	1.78 dd	1.85 dd	2.37	-	3.86, 3.76
	<i>J</i>	7.5, 1.2, 0.6	7.6, 1.0	7.6, 1.2	m	8.2, 4.7	8.2, 4.7	m	-	m

<sup>a</sup>Asignado en mezcla con la correspondiente 3-propanamida **9**.<sup>b</sup> Señales indistinguibles.

*anti-5a*:  $\delta$  5.80 (sa, NH), 3.26 (s, 3H, NMe), 1.91 (s, COMe).

*syn-5a*:  $\delta$  6.22 (sa, NH), 3.30 (s, 3H, NMe), 1.95 (s, COMe).

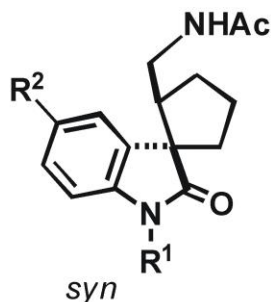
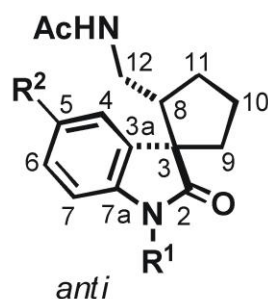
*anti-5b*:  $\delta$  5.93 (sa, NH), 3.26 (s, 3H, NMe), 1.93 (s, COMe).

*syn-5b*:  $\delta$  6.28 (sa, NH), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.28 (s, 3H, NMe), 1.95 (s, COMe).

*anti-5c*:  $\delta$  7.22 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.83 (m, 2H<sub>m</sub>), 6.04 (sa, NH), 4.94 y 4.84 (AB, 2H, *J* = 15.9 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 3H, OMe), 1.94 (s, COMe).

*syn-5c*:  $\delta$  7.24 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.83 (m, 2H<sub>m</sub>), 6.12 (sa, NH), 4.98 y 4.90 (AB, 2H, *J* = 15.5 Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OMe), 1.91 (s, COMe).

**Tabla 26.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los espirociclopentiloxindoles *anti/syn-6a* y *anti/syn-6f* en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>6a</b>	<b>6f</b>
R <sup>1</sup>	Me	Bn
R <sup>2</sup>	H	OMe

		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8 <sub>anti</sub>	H-8 <sub>syn</sub>	H-9 <sub>anti</sub>	H-9 <sub>syn</sub>
<i>anti-6a</i>	$\delta$	7.20 dd	7.07 td	7.29 td	6.86 da	-	2.66	1.83	2.24
	$J$	7.4, 0.9	7.6, 1.0	7.8, 1.3	7.8	-	m	m	m
<i>syn-6a</i>	$\delta$	7.19 dd	7.07 td	7.26 td	6.82 da	2.60	-	1.97	2.15
	$J$	7.5, 1.3	7.6, 1.2	7.6, 1.2	7.6	m	-	m	m
<i>anti-6f</i>	$\delta$	6.82	-	6.69	6.68	-	2.71	1.87	2.33
	$J$	- <sup>a</sup>	-	- <sub>a,b</sub>	- <sub>a,b</sub>	-	m	m	m
<i>syn-6f</i>	$\delta$	6.79	-	6.66	6.66	2.64	-	1.98	2.21
	$J$	- <sup>a</sup>	-	- <sub>a,b</sub>	- <sub>a,b</sub>	m	-	m <sup>b</sup>	m <sup>b</sup>

<sup>a</sup> El sistema no es de primer orden. Las constantes de acoplamiento características del anillo bencénico 1,2,4-trisustituído son indistinguibles. <sup>b</sup> Señal sobrepuesta. \*Señales asignadas por analogía con *syn-7a* (Tabla 6).

**Tabla 26.** (Continúa)

		H-10 <sub>anti</sub>	H-10 <sub>syn</sub>	H-11 <sub>anti</sub>	H-11 <sub>syn</sub>	H-12	NH	COMe
<b>anti-6a</b>	$\delta$	2.05 m <sup>b</sup>	2.05 m <sup>b</sup>	2.23 m	1.76 m	3.05, 2.78 m	5.61 sa	1.78 s
<b>syn-6a</b>	$\delta$	1.94* m	2.16* m	2.01 m <sup>b</sup>	2.01 m <sup>b</sup>	3.22 m	5.41 sa	1.60 s
<b>anti-6f</b>	$\delta$	2.07 m <sup>b</sup>	2.07 m <sup>b</sup>	2.24 m	1.76 m	3.17, 2.84 m	5.06 sa	1.70 s
<b>syn-6f</b>	$\delta$	1.94* m <sup>b</sup>	2.16* m <sup>b</sup>	1.98 m <sup>b</sup>	1.98 m <sup>b</sup>	3.22 m	5.28 sa	1.40 s

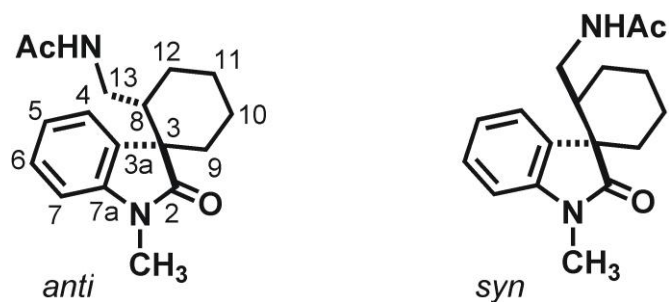
**anti-6a:**  $\delta$  3.22 (s, 3H, NMe).

**syn-6a:**  $\delta$  3.20 (s, 3H, NMe).

**anti-6f:**  $\delta$  7.35-7.20 (m, 5H, 2H<sub>o</sub> 2H<sub>m</sub> H <sub>$\rho$</sub> ); 4.94 y 4.85 (AB, 2H,  $J = 15.8$  Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.76 (s, 3H, OMe).

**syn-6f:**  $\delta$  7.35-7.25 (m, 5H, 2H<sub>o</sub> 2H<sub>m</sub> H <sub>$\rho$</sub> ); 5.00 y 4.71 (AB, 2H,  $J = 15.7$  Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.73 (s, 3H, OMe).

**Tabla 27.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los espirociclohexiloxindoles *anti/syn-7a* en  $\text{CDCl}_3$ .

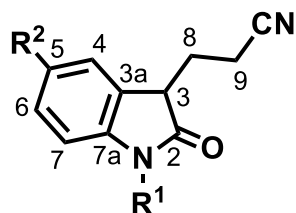


		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8 <sub>anti</sub>	H-8 <sub>syn</sub>	H-9 <sub>anti</sub>	H-9 <sub>syn</sub>
<i>anti-7a</i>	$\delta$	7.54 d	7.07 td	7.32 td	6.89 da	-	2.18	1.46	1.86
	$J$	7.6	7.6, 1.2	7.6, 1.2	7.6	-	m	m	m
<i>syn-7a</i>	$\delta$	7.17 dd	7.08 td	7.26 td	6.81 da	2.10	-	1.72	1.72
	$J$	7.5, 1.3	7.5, 1.0	7.6, 1.5	7.8	m	-	m <sup>a</sup>	m <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Señal sobrepuesta. <sup>b</sup> Señal asignada por cálculo del espectro teórico.

		H-10 <sub>anti/syn</sub>	H-11 <sub>anti/syn</sub>	H-12 <sub>anti/syn</sub> <sup>b</sup>	H-13	NH	COMe	NMe
<i>anti-7a</i>	$\delta$	1.74/1.74 <sup>a</sup>	2.00/1.53	1.62/1.83	2.81, 2.63	5.34	1.81	3.21
	$J$	m	m	m	m	sa	s	s
<i>syn-7a</i>	$\delta$	1.59/2.15	1.44/1.96	2.10/1.68	2.85	5.35	1.69	3.18
	$J$	m	m	m	m	sa	s	s

**Tabla 28.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los 3-propionitriloxindoles **8a-c**,<sup>a</sup> **8e** y **8f** en  $\text{CDCl}_3$ .

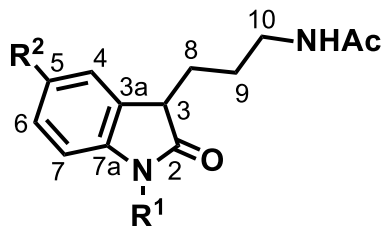


	<b>8a</b>	<b>8b</b>	<b>8c</b>	<b>8e</b>	<b>8f</b>
R <sup>1</sup>	Me	Me	<i>p</i> -OMeBn	Bn	Bn
R <sup>2</sup>	H	OMe	H	H	OMe

		H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9
<b>8a</b>	$\delta$	3.54 dd	7.25 dm	7.09 td	7.33 tm	6.86 br d	2.37, 2.17	2.58
	$J$	8.0, 5.1	7.7	7.6, 1.0	7.7	7.7	m	m
<b>8b</b>	$\delta$	3.51 dd	6.86	-	6.83 dd	6.76 br d	2.36, 2.15	2.57
	$J$	8.1, 5.1	m	-	8.4, 2.5	8.4	m	m
<b>8c</b>	$\delta$	3.58 dd	7.23	7.04 td	7.21	6.79 da	2.41, 2.21	2.60
	$J$	8.0, 5.1	m	7.6, 0.8	-	7.6	m	m
<b>8e</b>	$\delta$	3.63 dd	7.25	7.05 td	7.21 td	6.77 d	2.42, 2.21	2.62
	$J$	8.0, 5.2	m	7.6, 0.9	7.8, 0.9	7.9	m	m
<b>8f</b>	$\delta$	3.61 dd	6.86 d	-	6.72 dd	6.64 d	2.42, 2.20	2.61
	$J$	8.1, 4.9	2.3	-	8.0, 2.5	8.5	m	m

<sup>a</sup> **8d** no se sintetizó. **8a**:  $\delta$  3.21 (s, 3H, NMe). **8b**:  $\delta$  3.18 (s, 3H, NMe), 3.80 (s, 3H, OMe). **8c**:  $\delta$  7.23 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.84 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.83 (AB, 2H, NCH<sub>2</sub>), (s, 3H, OMe). **8e**:  $\delta$  7.32 (m, H<sub>p</sub>), 7.29 (m, 2H<sub>o</sub>), 7.27 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.90 (AB, 2H, NCH<sub>2</sub>). **8f**:  $\delta$  7.29 (m, H<sub>p</sub>), 7.27 (m, 2H<sub>o</sub>), 7.28 (m, 2H<sub>m</sub>), 4.87 (AB, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.76 (s, 3H, OMe).

**Tabla 29.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los 3-propilacetamidooxindoles **9a**,<sup>a</sup> **9c-f** en  $\text{CDCl}_3$ .



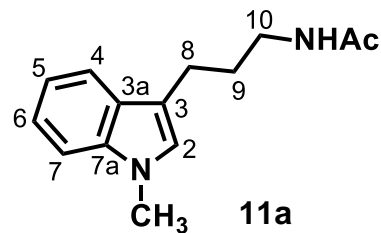
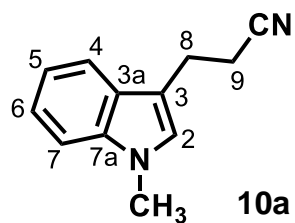
	<b>9a</b>	<b>9c</b>	<b>9d</b>	<b>9e</b>	<b>9f</b>
R <sup>1</sup>	Me	<i>p</i> -OMeBn	<i>p</i> -OMeBn	Bn	Bn
R <sup>2</sup>	H	H	OMe	H	OMe

		H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	NCH <sub>2</sub>
<b>9a</b>	$\delta$	3.46 t	7.25 da	7.07 td	7.28 td	6.84 da	2.0	1.54	3.25	-
	$J$	6.2	7.7	7.5, 1.0	8.0, 1.3	7.5	m	m	m	-
<b>9c</b>	$\delta$	3.54 t	7.25-7.19	7.02 td	7.17 tdd	6.76 da	2.01	1.58	3.21	4.86, 4.79
	$J$	5.4	m	7.9, 1.0	8.1, 1.3, 0.7	7.8	m	m	m	15.2
<b>9d</b>	$\delta$	3.52 t	6.83 d	-	6.68 d	6.64 d	2.02	1.57	3.24	4.81
	$J$	5.9	8.8	-	2.2	11.5	m	m	m	15.5
<b>9e</b>	$\delta$	3.60 t	7.23	7.03 td	7.17 td	6.74 da	2.04	1.59	3.22	4.94, 4.88
	$J$	6.0	m	7.6, 1.0	7.7, 0.8	7.8	m	m	m	15.4
<b>9f</b>	$\delta$	3.54 t	6.84 dd	-	6.68 dd	6.61 d	2.02	1.57	3.23	4.92, 4.83
	$J$	6.0	2.4, 0.7	-	8.6, 2.4	8.6	m	m	m	15.6

<sup>a</sup> **9b** ver Ref. 25. **9a**:  $\delta$  6.02 (sa, NH), 3.20 (s, 3H, NMe), 1.95 (s, COMe). **9c**:  $\delta$  7.25-7.19 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.83 (m, 2H<sub>m</sub>), 5.96 (sa, NH), 3.76 (s, 3H, OMe), 1.95 (s, COMe). **9d**:  $\delta$  7.21 (m, 2H<sub>o</sub>), 6.83 (m, 2H<sub>m</sub>), 5.94 (sa, NH), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.75 (s, 3H, OMe), 1.96 (s, COMe). **9e**:  $\delta$  7.30 (m, H<sub>p</sub>), 7.27 (m, 2H<sub>o</sub>), 7.24 (m, 2H<sub>m</sub>), 5.83 (sa, NH), 1.95 (s, COMe). **9f**:  $\delta$  7.29 (m, H<sub>p</sub>), 7.28 (m, 2H<sub>o</sub>), 7.25 (m, 2H<sub>m</sub>), 5.95 (sa, NH), 3.75 (s, 3H, OMe), 1.95 (s, COMe).

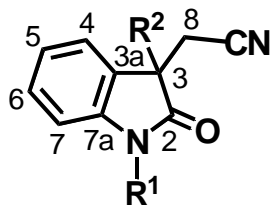


**Tabla 30.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) del 3-propionitrilindol **10a** y del 3-propilacetamidoindol **11a** en  $\text{CDCl}_3$ .



		H-2	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	NMe	NH	COMe
<b>10a</b>	$\delta$	6.95 s	7.51 dd	7.12 td	7.24 td	7.29 da	3.07 t	2.63 t	-	3.71 s	-	-
	$J$	-	7.8, 1.1	7.3, 1.4	6.9, 1.1	8.2	7.1	7.1	-	-	-	-
<b>11a</b>	$\delta$	6.81 s	7.54 dd	7.08 td	7.20 td	7.26 da	2.74 t	1.87	3.26	3.68	5.41	3.68
	$J$	-	7.9, 0.9	7.3, 1.3	7.5, 1.0	8.2	7.3	m	m	s	sa	s

**Tabla 31.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los oxindoles **1c**, **13e**, **14e**, **16**, **17** y **18** en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>1c</b>	<b>13e</b>	<b>14e</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
R <sup>1</sup>	<i>p</i> OMeBn	Bn	Bn	Ac	<i>t</i> -Boc	<i>t</i> -Boc
R <sup>2</sup>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Br	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> Br	H	H	<i>t</i> -Boc

		H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8
<b>1c</b>	$\delta$	3.73 ABX	7.49 d	7.25	7.08 td	6.80 da	3.14, 2.77 ABX
	$J$	8.8, 4.7	6.8	- <sup>a</sup>	7.6, 1.0	7.9	16.8, 8.8, 4.7
<b>13e</b>	$\delta$	-	7.44 d	7.12 td	7.26 td	6.82 da	2.90, 2.67 AB
	$J$	-	7.4	7.6, 1.0	7.8, 1.3	7.6	16.5
<b>14e</b>	$\delta$	-	7.43 d	7.11 td	7.26 td	6.81 da	2.89, 2.64 AB
	$J$	-	7.4	7.7, 1.1	7.7, 1.4	8.0	16.5
<b>16</b>	$\delta$	3.90 ABX	7.53 d	7.42 tdd	7.28 td	8.26 da	3.13, 2.84 ABX
	$J$	8.5, 5.0	7.5	7.6, 1.5, 0.9	7.6, 1.0	8.2	16.9, 8.5, 5.0
<b>17</b>	$\delta$	3.82 ABX	7.53 d	7.23 tm	7.39 tm	7.86 dm	3.13, 2.77 ABX
	$J$	8.8, 4.8	7.6	7.6	8.1	8.2	16.8, 8.8, 4.8
<b>18</b>	$\delta$	-	7.55 dm	7.29 td	7.34 td	8.03 dm	3.69 s
	$J$	-	7.7	7.3, 1.7	7.3, 1.5	7.8	-

<sup>a</sup> Señal sobrepuesta.

**Tabla 31.** (Continúa)

**1c:**  $\delta$  7.24 (m, 2H<sub>o</sub>); 6.84 (m, 2H<sub>m</sub>); 4.94 y 4.88 (2H, AB,  $J = 15.4$  Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.76 (3H, s, *p*-OMe).

**13e:**  $\delta$  7.31 (m, 2H<sub>p</sub>); 7.30 (m, 2H<sub>o</sub>); 7.29 (m, 2H<sub>m</sub>); 4.97 (2H, AB, NCH<sub>2</sub>); 3.24 (2H, m, CH<sub>2</sub>-11); 2.17 (2H, m, CH<sub>2</sub>-9); 1.62 y 1.41 (2H, m, CH<sub>2</sub>-10).

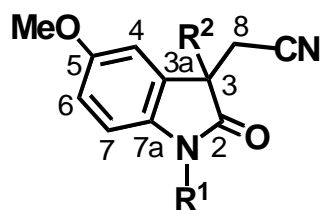
**14e:**  $\delta$  7.31 (m, 2H<sub>p</sub>); 7.30 (m, 2H<sub>o</sub>); 7.27 (m, 2H<sub>m</sub>); 5.02 y 4.86 (AB, 2H,  $J = 15.7$  Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.25 (2H, m, CH<sub>2</sub>-12); 2.04 (2H, m, CH<sub>2</sub>-9); 1.75 (2H, m, CH<sub>2</sub>-11); 1.20 y 1.00 (2H, m, CH<sub>2</sub>-10).

**16:**  $\delta$  2.69 (3H, s, AcO).

**17:**  $\delta$  1.64 (9H, s, *t*-Boc).

**18:**  $\delta$  1.67 (9H, s, *t*-Boc); 1.58 (9H, s, *t*-Boc).

**Tabla 32.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los oxindoles **1d** y **14f** en  $\text{CDCl}_3$ .



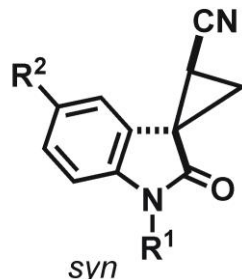
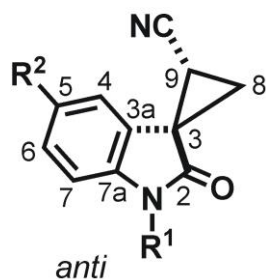
	<b>1d</b>	<b>14f</b>
R <sup>1</sup>	<i>p</i> OMeBn	Bn
R <sup>2</sup>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> Br

		H-3	H-4	H-6	H-7	H-8
<b>1d</b>	$\delta$	3.71 ABX	7.01 da	6.76 dd	6.67 da	3.13, 2.78 ABX
	$J$	8.8, 4.5	1.9	8.7, 2.4	8.6	16.9, 8.8, 4.5
<b>14f</b>	$\delta$	-	7.03 d	6.77 dd	6.69 da	2.88, 2.65 AB
	$J$	-	2.1	8.7, 2.5	8.2	16.6

**1d:**  $\delta$  7.23 (m, 2H<sub>o</sub>); 6.84 (m, 2H<sub>m</sub>); 4.86 y 4.79 (AB, 2H,  $J$  = 15.5 Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.75 (3H, s, *p*-OMe); 3.76 (3H, s, OMe).

**14f:**  $\delta$  7.31 (m, 2H<sub>p</sub>); 7.30 (m, 2H<sub>o</sub>); 7.29 (m, 2H<sub>m</sub>); 5.00 y 4.84 (AB, 2H,  $J$  = 15.5 Hz, NCH<sub>2</sub>); 3.78 (3H, s, OMe); 3.27 (2H, m, CH<sub>2</sub>-12); 2.03 (2H, m, CH<sub>2</sub>-9); 1.77 (2H, m, CH<sub>2</sub>-11); 1.21 y 1.02 (2H, 2m, CH<sub>2</sub>-10).

**Tabla 33.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm) de los espirociclopropiloxindoles *anti/syn-2c-f* en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>2c</b>	<b>2d</b>	<b>2e</b>	<b>2f</b>
R <sup>1</sup>	<i>p</i> -OMeBn	<i>p</i> -OMeBn	Bn	Bn
R <sup>2</sup>	H	OMe	H	OMe

		C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	CN
<i>anti-2c</i>	$\delta$	173.0	31.6	124.1	120.9	128.7	122.8	109.6	143.3	21.5	14.9	116.8
<i>syn-2c</i>	$\delta$	171.5	31.8	125.9	118.9	128.6	122.4	109.6	143.0	21.2	15.2	115.9
<i>anti-2d</i>	$\delta$	172.7	31.9	125.3	108.0	156.0	113.4	110.1	136.5	21.5	14.8	116.8
<i>syn-2d</i>	$\delta$	171.1	32.0	127.2	106.5	155.8	112.6	110.0	136.3	21.2	15.1	115.8
<i>anti-2e</i>	$\delta$	173.0	31.5	124.0	120.9	122.8	128.6	109.5	143.2	21.5	14.9	116.7
<i>syn-2e</i>	$\delta$	171.5	31.9	125.8	118.9	122.5	128.5	109.6	142.9	21.2	15.2	115.8
<i>anti-2f</i>	$\delta$	172.8	31.9	125.3	108.1	156.1	113.5	110.2	136.5	21.6	15.0	116.8
<i>syn-2f</i>	$\delta$	171.2	31.9	127.1	106.5	155.8	112.6	109.9	136.2	21.2	15.1	115.9

**Tabla 33** (Continua)

*anti-2c*:  $\delta$  159.2 ( $C_p$ ), 128.8 ( $2C_o$ ), 127.4 ( $C_i$ ); 114.2 ( $2C_m$ ), 55.2 (OMe), 43.9 (NCH<sub>2</sub>)

*syn-2c*:  $\delta$  159.1 ( $C_p$ ), 128.9 ( $2C_o$ ), 127.5 ( $C_i$ ); 114.1 ( $2C_m$ ), 55.2 (OMe), 43.8 (NCH<sub>2</sub>)

*anti-2d*:  $\delta$  159.1 ( $C_p$ ), 128.7 ( $2C_o$ ), 127.4 ( $C_i$ ); 114.1 ( $2C_m$ ), 55.2 (OMe), 43.9 (NCH<sub>2</sub>), 55.7 (OMe)

*syn-2d*:  $\delta$  158.9 ( $C_p$ ), 128.7 ( $2C_o$ ), 127.5 ( $C_i$ ); 114.0 ( $2C_m$ ), 55.0 (OMe), 43.7 (NCH<sub>2</sub>), 55.6 (OMe)

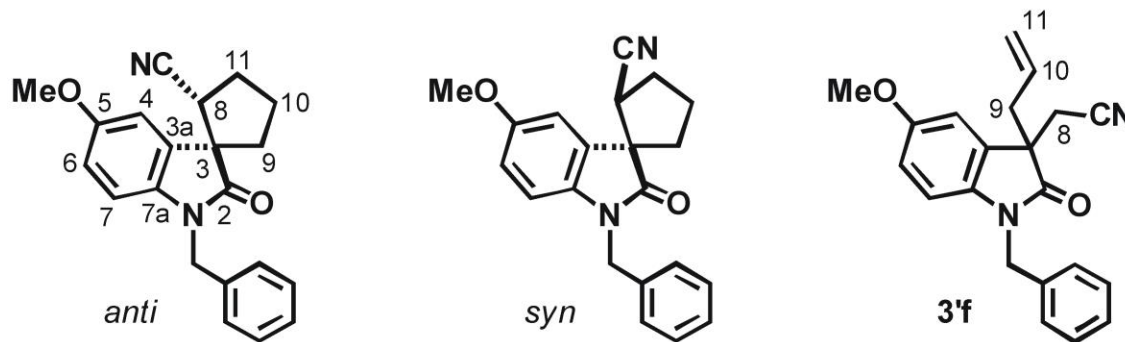
*anti-2e*:  $\delta$  135.1 ( $C_i$ ); 128.8 ( $C_p$ ), 127.7 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 44.4 (NCH<sub>2</sub>)

*syn-2e*:  $\delta$  135.4 ( $C_i$ ); 128.7 ( $C_p$ ), 127.7 ( $2C_m$ ), 127.4 ( $2C_o$ ), 44.3 (NCH<sub>2</sub>)

*anti-2f*:  $\delta$  135.4 ( $C_i$ ); 128.8 ( $C_p$ ), 127.8 ( $2C_m$ ), 127.3 ( $2C_o$ ), 44.5 (NCH<sub>2</sub>), 55.8 (OMe)

*syn-2f*:  $\delta$  135.4 ( $C_i$ ); 128.5 ( $C_p$ ), 127.5 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 44.2 (NCH<sub>2</sub>), 55.6 (OMe)

**Tabla 34.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm) de los espirociclopentiloxindoles *anti/syn-3f* y de **3'f** en  $\text{CDCl}_3$ .



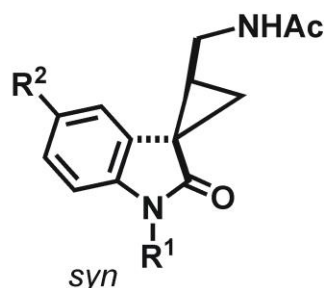
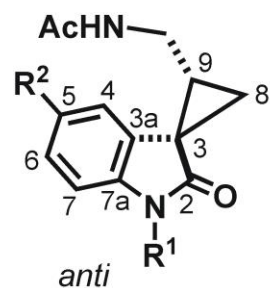
		C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	C-10	C-11	CN
<i>anti-3f</i>	$\delta$	177.8	56.5	131.9	111.8	156.2	112.6	109.8	135.5	38.4	37.4	24.4	31.5	119.0
<i>syn-3f</i>	$\delta$	177.4	56.6	131.6	109.7	156.2	112.6	109.8	136.0	39.5	36.8	24.3	30.5	118.9
<b>3'f</b>	$\delta$	176.0	49.2	130.0	110.8	156.3	113.4	110.1	135.7	25.2	40.4	130.6	120.5	116.3

*anti-3f*:  $\delta$  135.3 ( $C_i$ ), 128.8 ( $C_p$ ), 127.6 ( $2C_m$ ), 126.9 ( $2C_o$ ), 44.1 ( $\text{NCH}_2$ ), 55.7 (OMe)

*syn-3f*:  $\delta$  135.3 ( $C_i$ ), 128.6 ( $C_p$ ), 127.5 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 43.8 ( $\text{NCH}_2$ ), 55.7 (OMe)

**3'f**:  $\delta$  135.2 ( $C_i$ ), 128.7 ( $C_p$ ), 127.7 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 44.0 ( $\text{NCH}_2$ ), 55.7 (OMe)

**Tabla 35.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm) de los espirociclopropiloxindoles *anti/syn-5a*, *anti/syn-5b* y *anti/syn-5c* en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>5a</b>	<b>5b</b>	<b>5c</b>
R <sup>1</sup>	Me	Me	<i>p</i> -OMeBn
R <sup>2</sup>	H	OMe	H

		C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	C-10	<u>C</u> OMe	CO <u>M</u> e
<i>anti-5a</i>	$\delta$	176.2	31.2	127.2	120.7	122.0	127.1	108.2	144.0	31.2	22.8	38.1	170.1	23.1
<i>syn-5a</i>	$\delta$	176.2	30.6	130.7	118.2	122.3	126.8	108.0	142.7	32.6	23.9	36.5	170.2	23.3
<i>anti-5b</i>	$\delta$	176.0	31.6	128.7	111.2	155.6	114.0	108.4	137.6	22.8	31.1	37.8	170.2	23.0
<i>syn-5b</i>	$\delta$	176.0	30.9	132.1	105.6	156.1	111.3	108.3	136.3	24.0	32.8	36.6	170.3	23.3
<i>anti-5c</i>	$\delta$	176.3	31.1	127.2	120.8	121.9	126.9	109.2	143.0	30.3	23.0	37.9	170.1	23.1
<i>syn-5c</i>	$\delta$	176.3	30.6	128.1	118.2	122.3	126.7	108.9	141.9	33.1	24.2	36.8	170.2	23.3

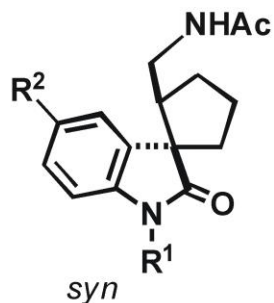
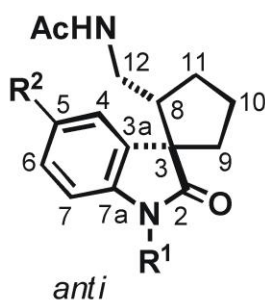
*anti-5a*:  $\delta$  26.6 (NMe). *syn-5a*:  $\delta$  26.6 (NMe). *anti-5b*:  $\delta$  26.6 (NMe), 55.8 (OMe). *syn-5b*:  $\delta$  26.6 (NMe), 55.8 (OMe)

*anti-5c*:  $\delta$  158.9 ( $C_p$ ), 128.6 ( $2C_o$ ), 128.0 ( $C_i$ ), 114.0 ( $2C_m$ ), 55.1 (OMe), 43.5 (NCH<sub>2</sub>)

*syn-5c*:  $\delta$  159.1 ( $C_p$ ), 128.5 ( $2C_o$ ), 130.7 ( $C_i$ ), 114.2 ( $2C_m$ ), 55.3 (OMe), 43.5 (NCH<sub>2</sub>)



**Tabla 36.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm) de los espirociclopentiloxindoles *anti/syn-6a* y *anti/syn-6f* en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>6a</b>	<b>6f</b>
R <sup>1</sup>	Me	Bn
R <sup>2</sup>	H	OMe

		C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12
<i>anti-6a</i>	$\delta$	180.2	56.6	131.7	123.8	122.5	127.6	108.0	142.8	49.1	37.8	23.3	29.9	40.2
<i>syn-6a</i>	$\delta$	179.9	56.3	134.4	122.0	122.8	127.6	107.7	143.0	50.8	38.2	23.7	29.4	40.2
<i>anti-6f</i>	$\delta$	180.2	57.1	133.2	112.3	155.9	111.3	109.3	135.6	49.1	38.5	23.3	30.1	40.4
<i>syn-6f</i>	$\delta$	179.6	56.5	135.2	109.7	156.2	111.5	108.9	135.9	50.0	38.5	23.9	29.5	40.4

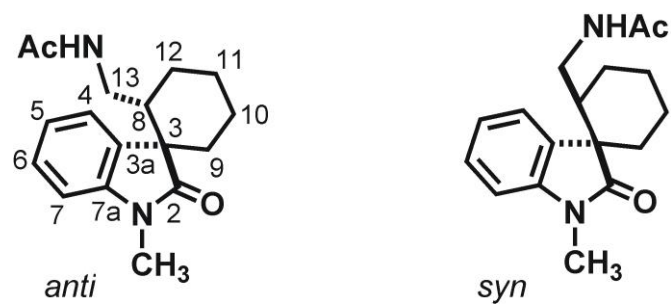
*anti-6a*:  $\delta$  169.4 (COMe), 26.2 (NMe), 22.8 COMe

*syn-6a*:  $\delta$  169.7 (COMe), 26.0 (NMe), 22.8 COMe

*anti-6f*:  $\delta$  169.5 (COMe), 135.9 ( $C_i$ ), 128.8 ( $C_p$ ), 127.6 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 55.7 (OMe), 44.0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 22.9 COMe

*syn-6f*:  $\delta$  169.7 (COMe), 136.1 ( $C_i$ ), 128.8 ( $C_p$ ), 127.7 ( $2C_m$ ), 127.4 ( $2C_o$ ), 55.6 (OMe), 43.6 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 22.4 COMe

**Tabla 37.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm) de los espirociclohexiloxindoles *anti/syn-7a* en  $\text{CDCl}_3$ .

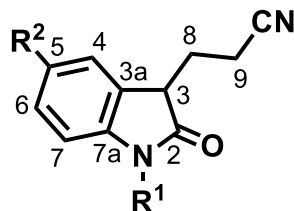


		C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	C-10	C-11
<i>anti-7a</i>	$\delta$	180.5	51.3	131.1	125.3	122.1	127.9	108.4	143.1	42.0	34.9	21.0	26.1
<i>syn-7a</i>	$\delta$	178.7	49.5	134.2	121.8	122.6	127.7	107.8	142.8	43.0	35.9	20.3	25.5

		C-12	C-13	<u>COMe</u>	<u>COMe</u>	NMe
<i>anti-7a</i>	$\delta$	25.1	42.0	169.6	23.0	26.2
<i>syn-7a</i>	$\delta$	25.0	41.8	169.7	22.9	25.8

**Tabla 38.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm) de los 3-propionitriloxindoles **8a-c**, **8e** y **8f** en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>8a</b>	<b>8b</b>	<b>8c</b>	<b>8e</b>	<b>8f</b>
R <sup>1</sup>	Me	Me	<i>p</i> -OMeBn	Bn	Bn
R <sup>2</sup>	H	OMe	H	H	OMe

		C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	CN
<b>8a</b>	$\delta$	176.3	43.6	126.8	123.7	122.7	128.7	108.4	144.2	26.5	14.0	119.0
<b>8b</b>	$\delta$	175.7	43.8	128.0	111.2	155.9	112.5	108.5	137.5	26.4	13.8	118.9
<b>8c</b>	$\delta$	176.3	43.5	126.8	123.7	122.6	128.5	109.3	143.2	26.6	13.9	119.0
<b>8e</b>	$\delta$	176.4	43.5	126.8	123.8	122.8	128.5	109.3	143.2	26.7	13.9	119.0
<b>8f</b>	$\delta$	175.9	43.9	128.1	111.3	156.0	112.6	109.7	136.6	26.7	13.9	119.0

**8a:**  $\delta$  26.2 (NMe)

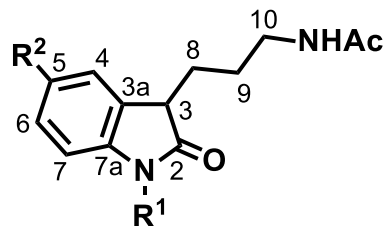
**8b:**  $\delta$  26.1 (NMe), 55.6 (OMe)

**8c:**  $\delta$  159.0 ( $C_p$ ), 128.6 ( $2C_o$ ), 127.6 ( $C_i$ ), 114.1 ( $2C_m$ ), 55.1 (OMe), 43.1 (NCH<sub>2</sub>)

**8e:**  $\delta$  135.5 ( $C_i$ ), 128.8 ( $C_p$ ), 127.7 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 43.7 (NCH<sub>2</sub>)

**8f:**  $\delta$  135.6 ( $C_i$ ), 128.7 ( $C_p$ ), 127.6 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 43.7 (NCH<sub>2</sub>), 55.7 (OMe)

**Tabla 39.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm) de los 3-propilacetamidooxindoles **9a**, **9c-f** en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>9a</b>	<b>9c</b>	<b>9d</b>	<b>9e</b>	<b>9f</b>
R <sup>1</sup>	Me	<i>p</i> -OMeBn	<i>p</i> -OMeBn	Bn	Bn
R <sup>2</sup>	H	H	OMe	H	OMe

		C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	C-10	<u>COMe</u>	COMe
<b>9a</b>	$\delta$	177.8	44.9	128.6	123.7	122.5	128.0	108.0	144.1	27.6	25.6	39.1	170.2	23.2
<b>9c</b>	$\delta$	177.9	44.9	126.8	123.8	122.5	127.9	109.0	143.2	27.7	25.6	39.1	170.2	23.2
<b>9d</b>	$\delta$	177.4	45.3	129.9	111.4	155.9	111.9	109.3	136.7	27.7	25.5	39.1	170.1	23.2
<b>9e</b>	$\delta$	177.9	44.9	128.6	123.9	122.6	127.9	109.1	143.2	27.7	25.6	39.1	170.2	23.3
<b>9f</b>	$\delta$	177.6	45.3	129.9	111.4	155.9	111.9	109.3	136.6	27.7	25.5	39.1	170.2	23.2

**9a:**  $\delta$  26.1 (NMe)

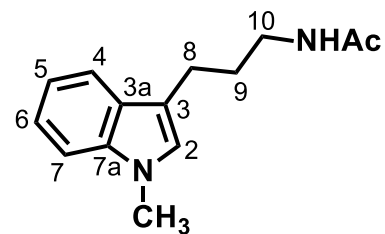
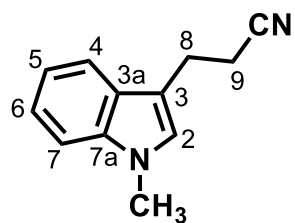
**9c:**  $\delta$  159.0 ( $C_p$ ), 128.6 ( $2C_o$ ), 127.8 ( $C_i$ ), 114.1 ( $2C_m$ ), 55.2 (OMe), 43.1 (NCH<sub>2</sub>)

**9d:**  $\delta$  159.0 ( $C_p$ ), 128.6 ( $2C_o$ ), 127.9 ( $C_i$ ), 114.1 ( $2C_m$ ), 55.2 (OMe), 43.2 (NCH<sub>2</sub>), 55.2 (OMe)

**9e:**  $\delta$  135.8 ( $C_i$ ); 128.7 ( $C_p$ ), 127.6 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 43.7 (NCH<sub>2</sub>)

**9f:**  $\delta$  135.8 ( $C_i$ ); 128.7 ( $C_p$ ), 127.5 ( $2C_m$ ), 127.2 ( $2C_o$ ), 43.7 (NCH<sub>2</sub>), 55.7 (OMe)

**Tabla 40.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm) del 3-propionitrilindol **10a** y del 3-propilacetamidoindol **11a** en  $\text{CDCl}_3$ .

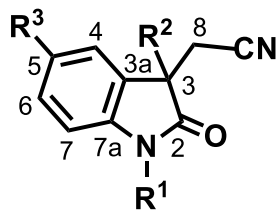


		C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9	C-10	NMe
<b>10a</b>	$\delta$	126.7	110.9	126.8	118.1	119.0	121.8	109.4	136.9	21.4	18.7	-	32.5
<b>11a</b>	$\delta$	126.7	113.8	127.6	118.7	118.5	121.4	109.1	136.9	22.3	29.8	39.3	32.4

**10a:**  $\delta$  119.7 (CN)

**11a:**  $\delta$  170.1 (COMe), 23.1 (COMe)

**Tabla 41.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : ppm,  $J$ : Hz) de los oxindoles **1c**, **1d**, **13e**, **14e**, **14f**, **16**, **17** y **18** en  $\text{CDCl}_3$ .



	<b>1c</b>	<b>1d</b>	<b>13e</b>	<b>14e</b>	<b>14f</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
R <sup>1</sup>	<i>p</i> OMeBn	<i>p</i> OMeBn	Bn	Bn	Bn	Ac	<i>t</i> -Boc	<i>t</i> -Boc
R <sup>2</sup>	H	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Br	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> Br	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> Br	H	H	<i>t</i> -Boc
R <sup>3</sup>	H	OMe	H	H	OMe	H	H	H

		<b>1c</b>	<b>1d</b>	<b>13e</b>	<b>14e</b>	<b>14f</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
C-2	$\delta$	174.2	173.9	176.5	176.8	176.3	175.1	172.6	139.4
C-3	$\delta$	41.3	41.7	48.5	48.8	49.2	42.2	41.9	97.2
C-3a	$\delta$	125.5	126.8	128.5	128.8	130.0	124.5	124.3	125.0
C-4	$\delta$	124.1	111.4	123.3	123.2	110.4	123.7	123.8	118.0
C-5	$\delta$	129.2	156.2	123.2	123.3	156.3	129.8	124.8	123.3
C-6	$\delta$	123.0	113.6	129.4	129.2	113.4	125.7	129.5	124.8
C-7	$\delta$	109.6	110.1	109.8	109.7	110.1	117.0	115.3	115.5
C-7a	$\delta$	143.2	136.5	142.4	142.5	135.7	140.5	139.9	131.7
C-8	$\delta$	19.0	19.0	26.1	26.1	26.1	19.4	19.2	11.6
CN	$\delta$	117.0	117.0	116.2	116.4	116.3	116.5	116.7	116.2

**Tabla 41.** (Continúa)

**1c:**  $\delta$  159.1 ( $C_p$ ); 128.6 ( $2C_o$ ); 127.1 ( $C_i$ ); 114.1 ( $2C_m$ ); 55.2 (OMe); 43.4 (NCH<sub>2</sub>).

**1d:**  $\delta$  159.1 ( $C_p$ ); 128.6 ( $2C_o$ ); 127.2 ( $C_i$ ); 114.1 ( $2C_m$ ); 55.7 (OMe); 55.1 ( $p$ -OMe); 43.5 (NCH<sub>2</sub>).

**13e:**  $\delta$  135.2 ( $C_i$ ); 128.9 ( $C_p$ ); 127.9 ( $2C_m$ ); 127.2 ( $2C_o$ ); 44.1 (NCH<sub>2</sub>); 34.8 (C-9); 32.3 (C-11); 27.3 (C-10).

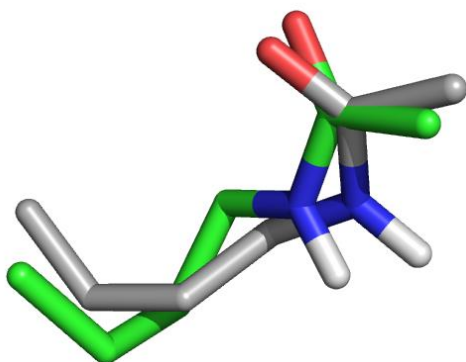
**14e:**  $\delta$  135.2 ( $C_i$ ); 128.8 ( $C_p$ ); 127.8 ( $2C_m$ ); 127.3 ( $2C_o$ ); 44.0 (NCH<sub>2</sub>); 35.3 (C-9); 32.8 (C-12); 32.1 (C-11); 22.8 (C-10).

**14f:**  $\delta$  135.2 ( $C_i$ ); 128.8 ( $C_p$ ); 127.7 ( $2C_m$ ); 127.2 ( $2C_o$ ); 55.7 (OMe); 44.0 (NCH<sub>2</sub>); 35.3 (C-9); 32.8 (C-12); 32.1 (C-11); 22.8 (C-10).

**16:**  $\delta$  26.6 (Me, AcO); 170.4 (CO, AcO).

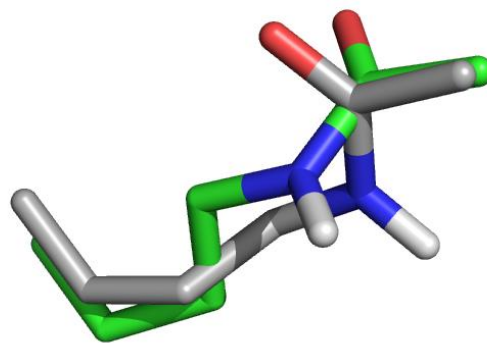
**17:**  $\delta$  27.9 (3 Me,  $t$ -Boc); 84.9 (C,  $t$ -Boc); 148.5 (C=O,  $t$ -Boc).

**18:**  $\delta$  28.0 (3 Me, N1- $t$ -Boc); 84.9 (C, N1- $t$ -Boc); 149.6 (C=O, N1- $t$ -Boc); 27.5 (3Me, C3- $t$ -Boc); 85.7 (C, C3- $t$ -Boc); 148.4 (C=O, C3- $t$ -Boc)



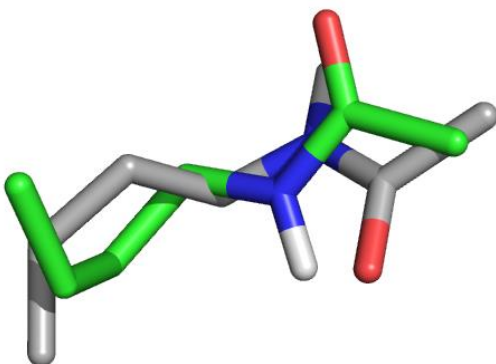
C<sub>1</sub> MLT vs C<sub>1</sub> *anti-7a*

RMSD = 1.638 Å



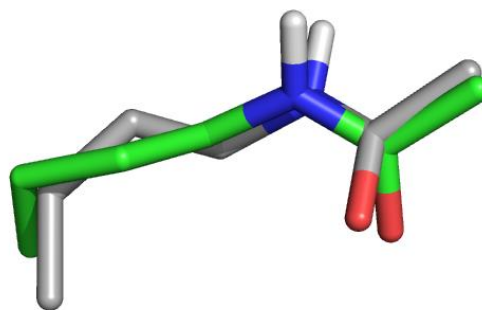
C<sub>1</sub> MLT vs C<sub>2</sub> *anti-7a*

RMSD = 0.885 Å



C<sub>2</sub> MLT vs C<sub>1</sub> *anti-7a*

RMSD = 1.774 Å

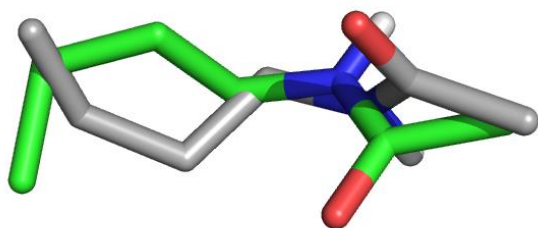


C<sub>2</sub> MLT vs C<sub>2</sub> *anti-7a*

RMSD = 1.190 Å

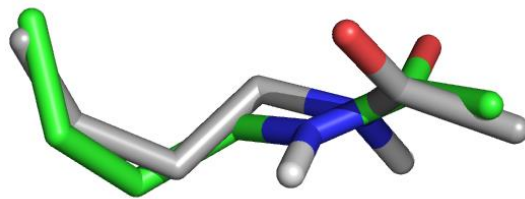
**Figura 37.** Estructuras alineadas del fragmento C3a-C3-C $\beta$ -C $\alpha$ -N-CO de las conformaciones más estables C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> de MLT (gris) con C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> de *anti-7a* (verde). Error cuadrático medio (RMSD, de sus siglas en inglés).





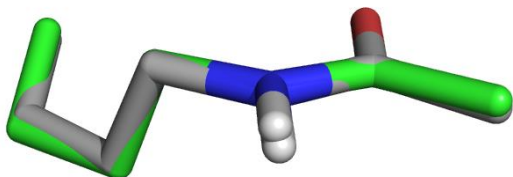
C<sub>1</sub> MLT vs C<sub>1</sub> *syn-7a*

RMSD = 1.654 Å



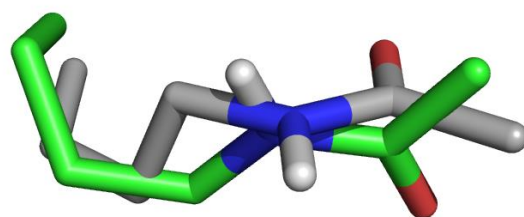
C<sub>1</sub> MLT vs C<sub>2</sub> *syn-7a*

RMSD = 1.789 Å



C<sub>2</sub> MLT vs C<sub>1</sub> *syn-7a*

RMSD = 0.129 Å



C<sub>2</sub> MLT vs C<sub>2</sub> *syn-7a*

RMSD = 1.859 Å

**Figura 38.** Estructuras alineadas del fragmento C3a-C3-Cβ-Cα-N-CO de las conformaciones más estables C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> de MLT (gris) con C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> de *syn-7a* (verde). Error cuadrático medio (RMSD, de sus siglas en inglés).

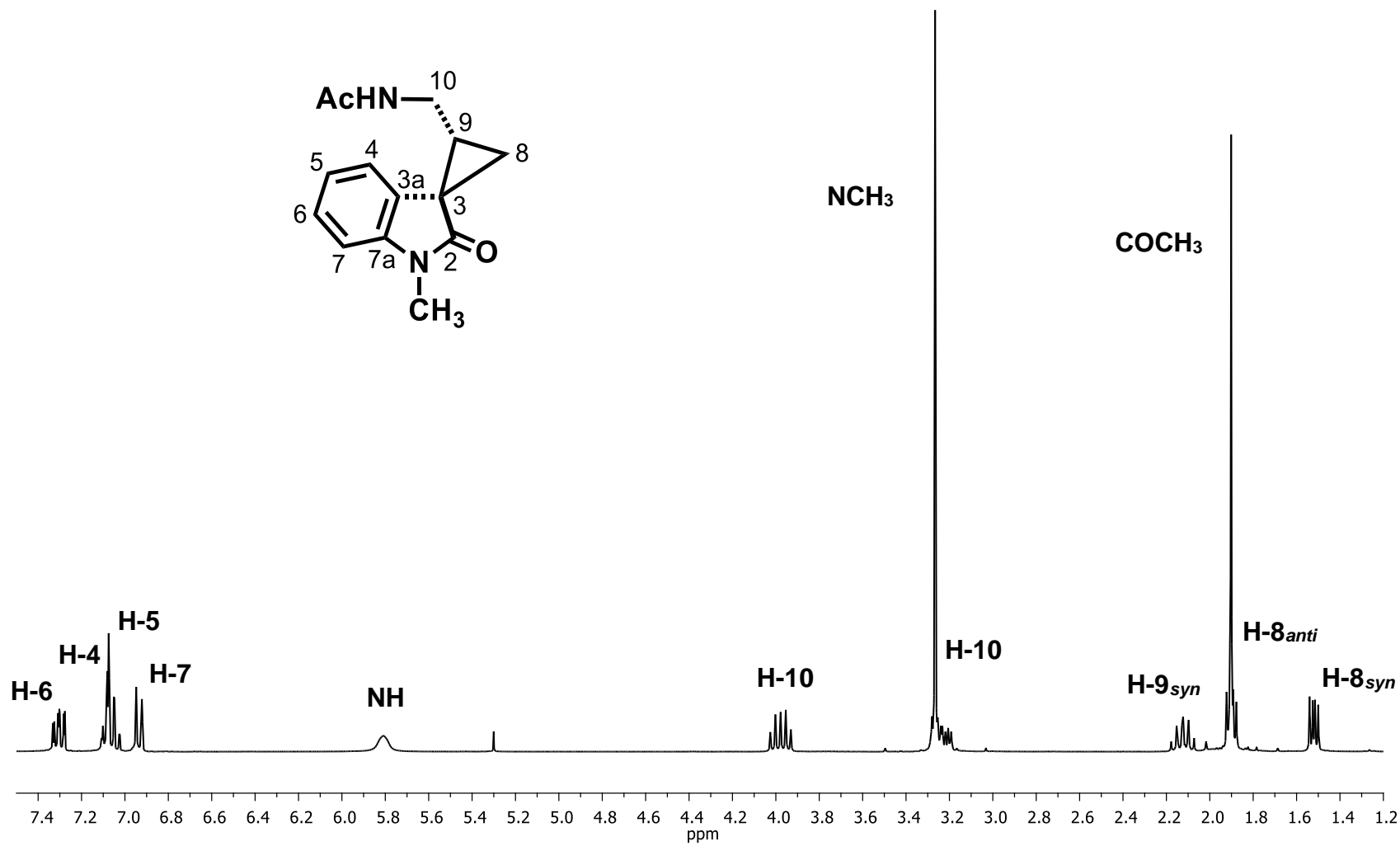
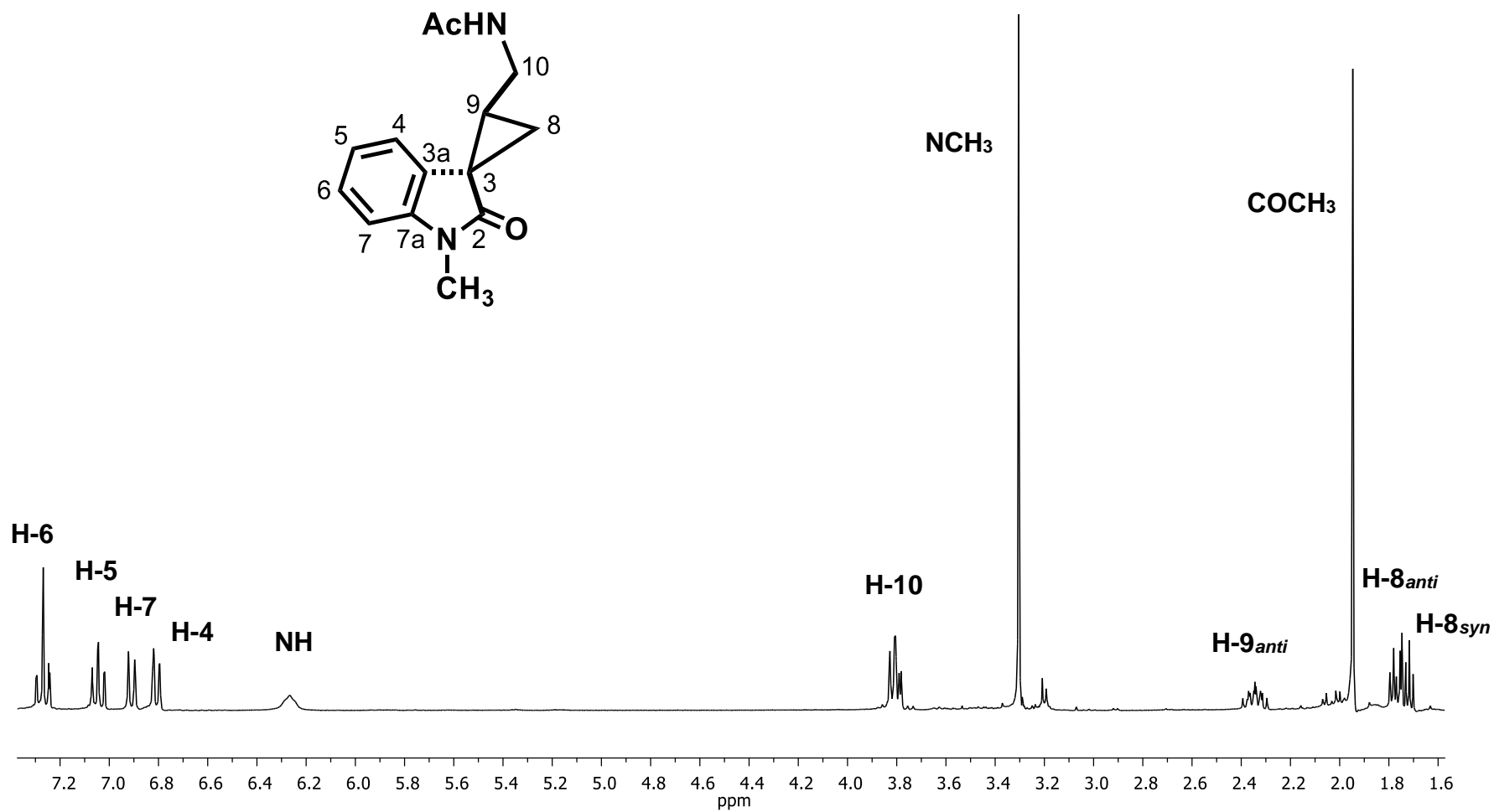


Figura 39. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de *anti*-5a en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 40.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de *syn*-5a en CDCl<sub>3</sub>.

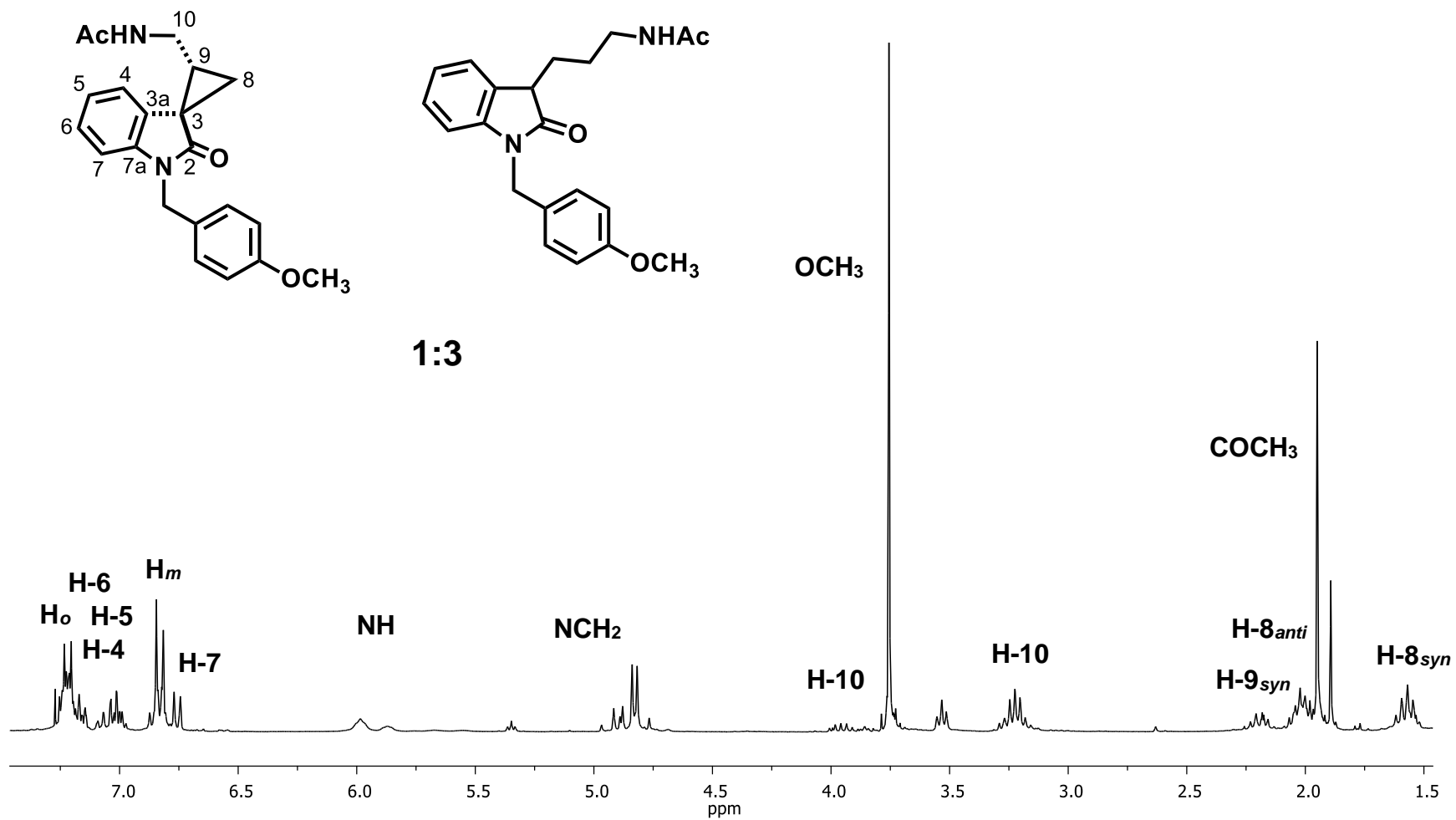


Figura 41. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de *anti*-5c en mezcla con 9c en  $\text{CDCl}_3$ .

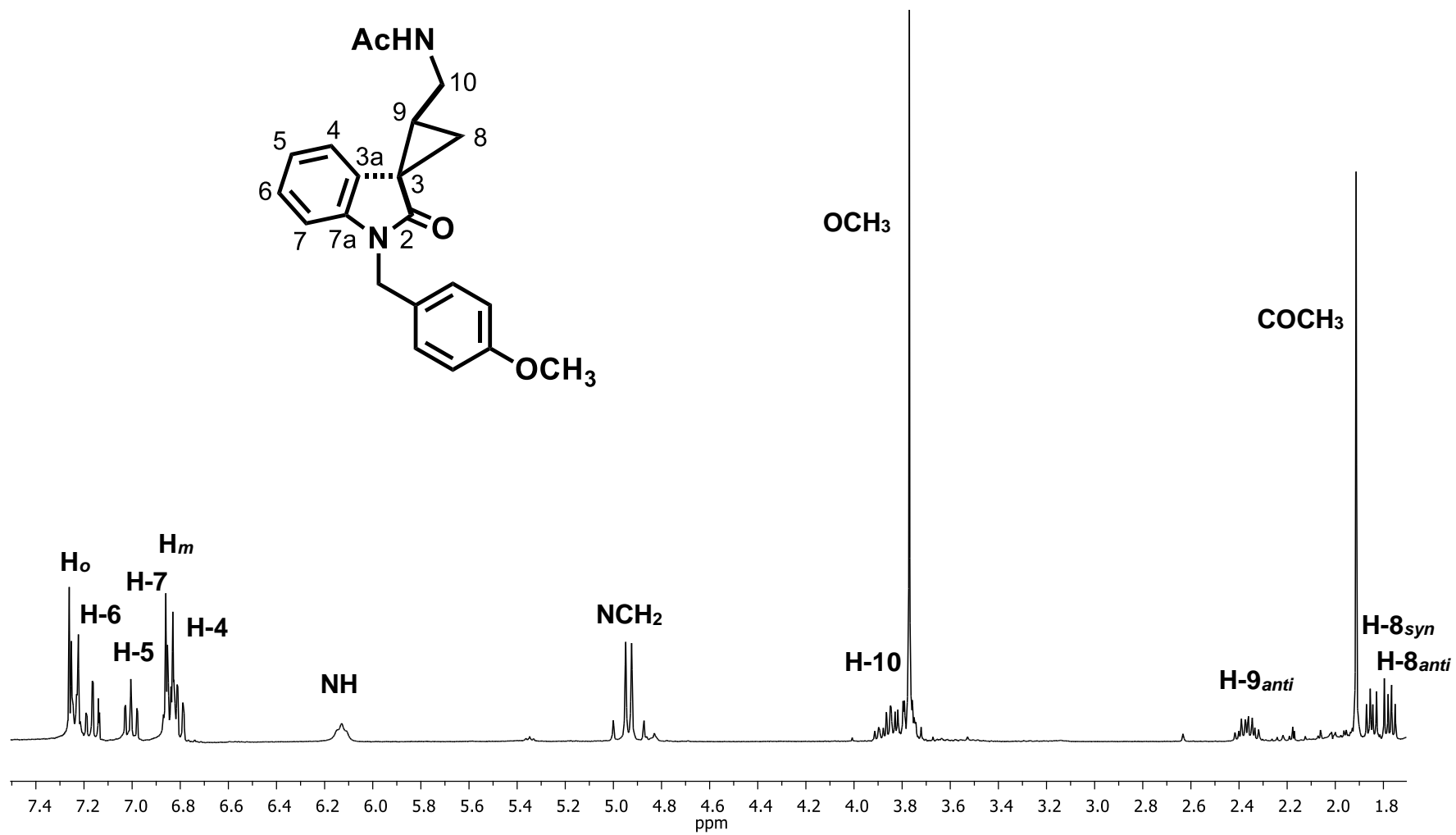


Figura 42. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de *syn*-5c en CDCl<sub>3</sub>.

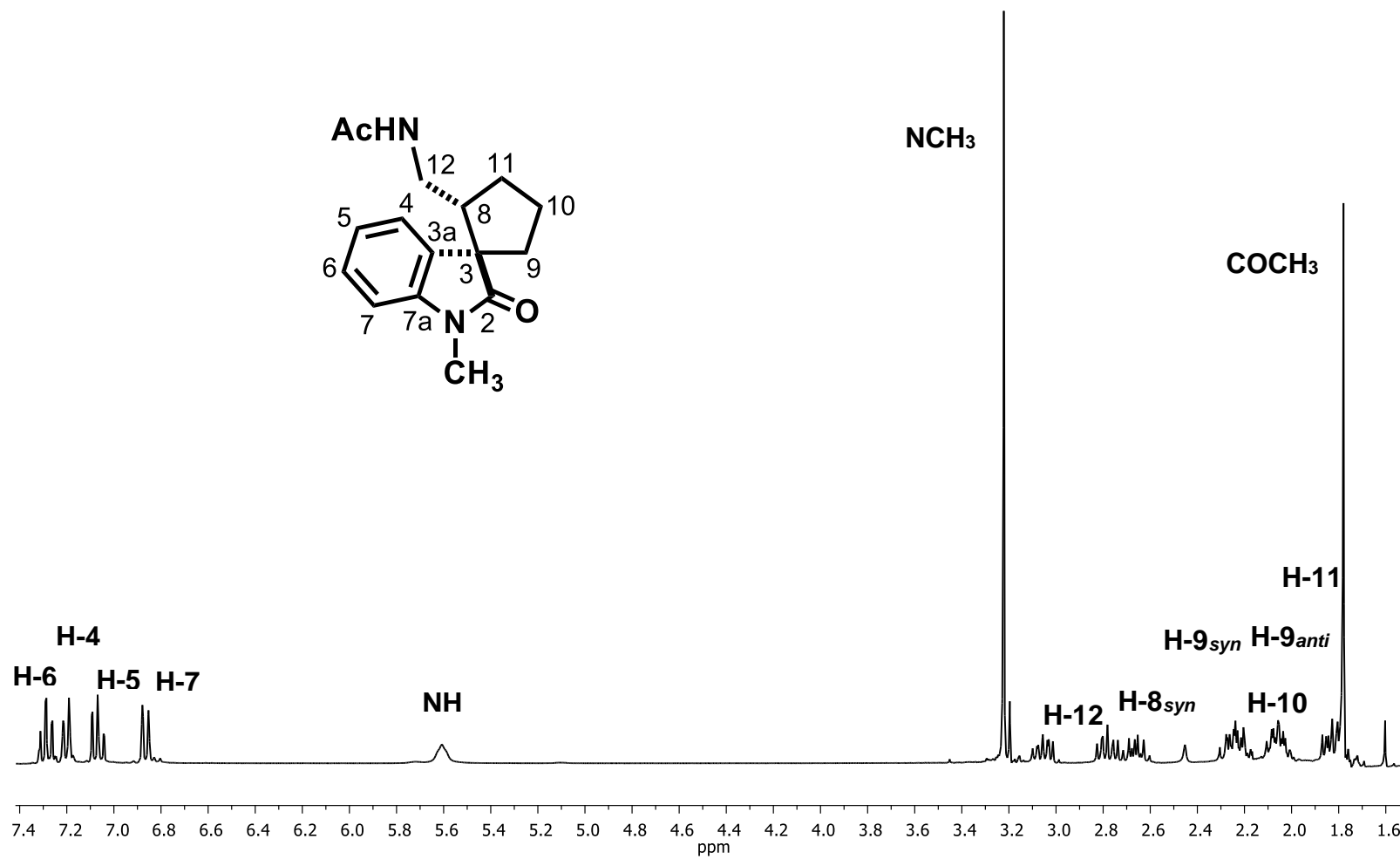


Figura 43. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de *anti*-6a en CDCl<sub>3</sub>.

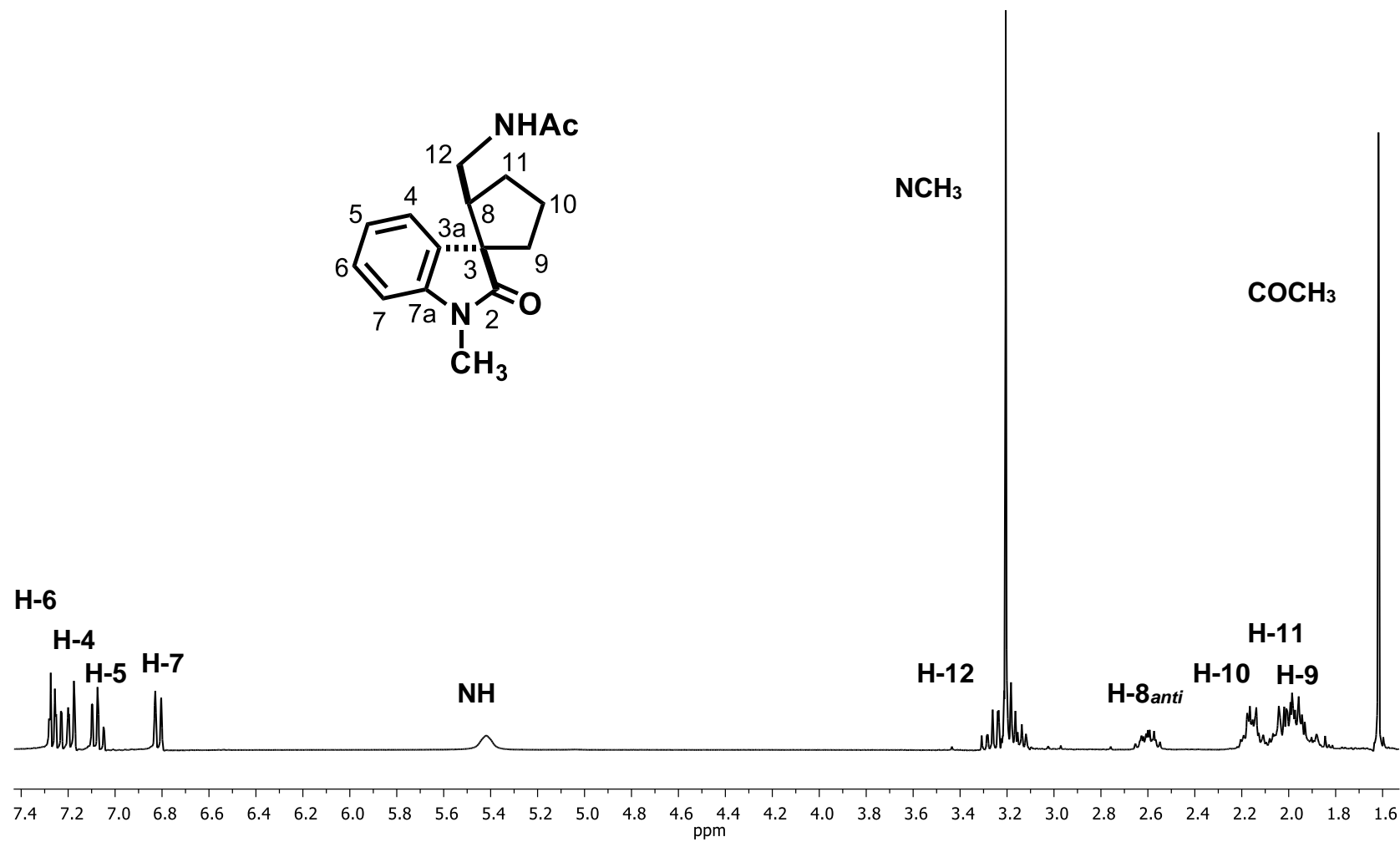


Figura 44. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de *syn*-6a en CDCl<sub>3</sub>.

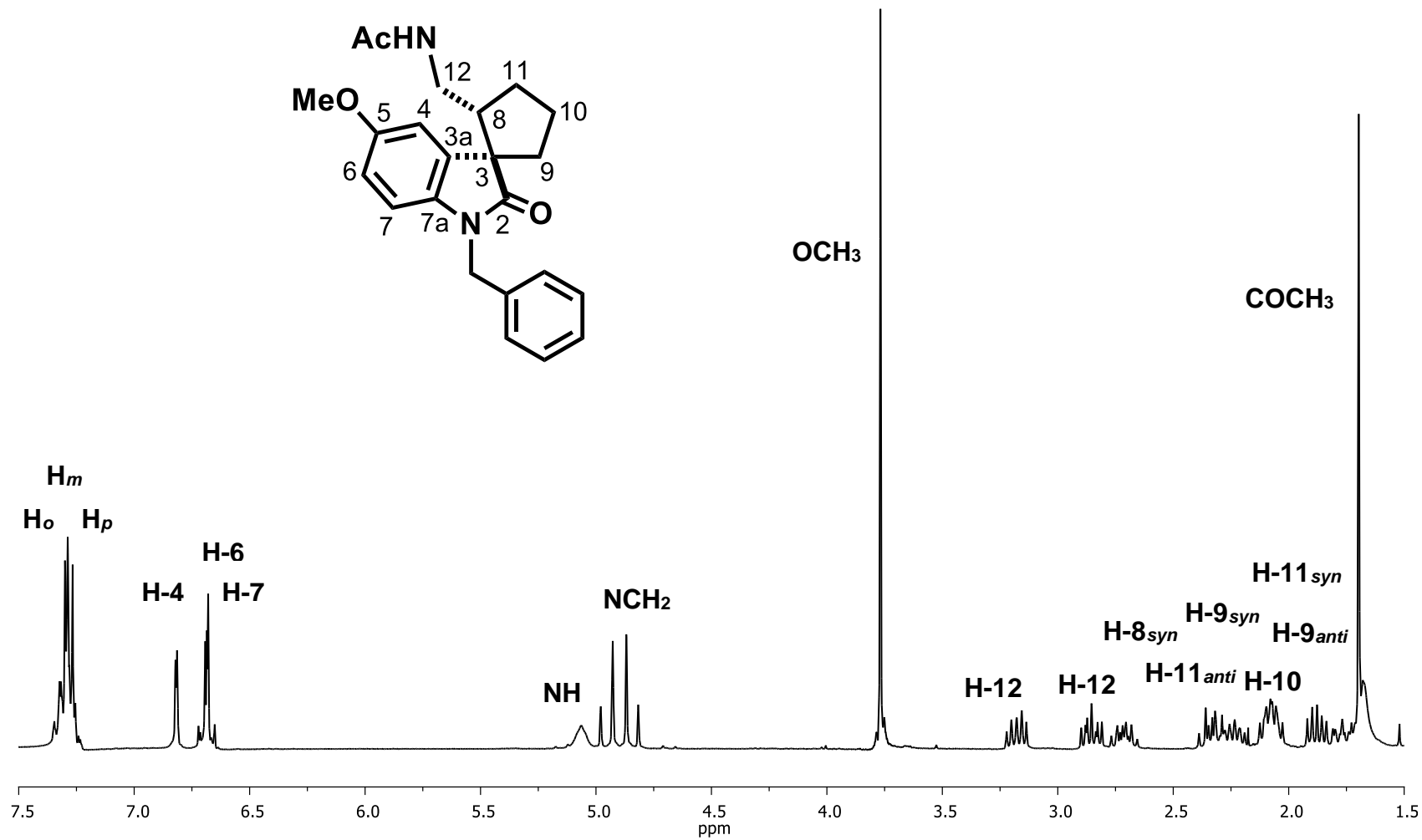


Figura 45. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de *anti*-6f en CDCl<sub>3</sub>.



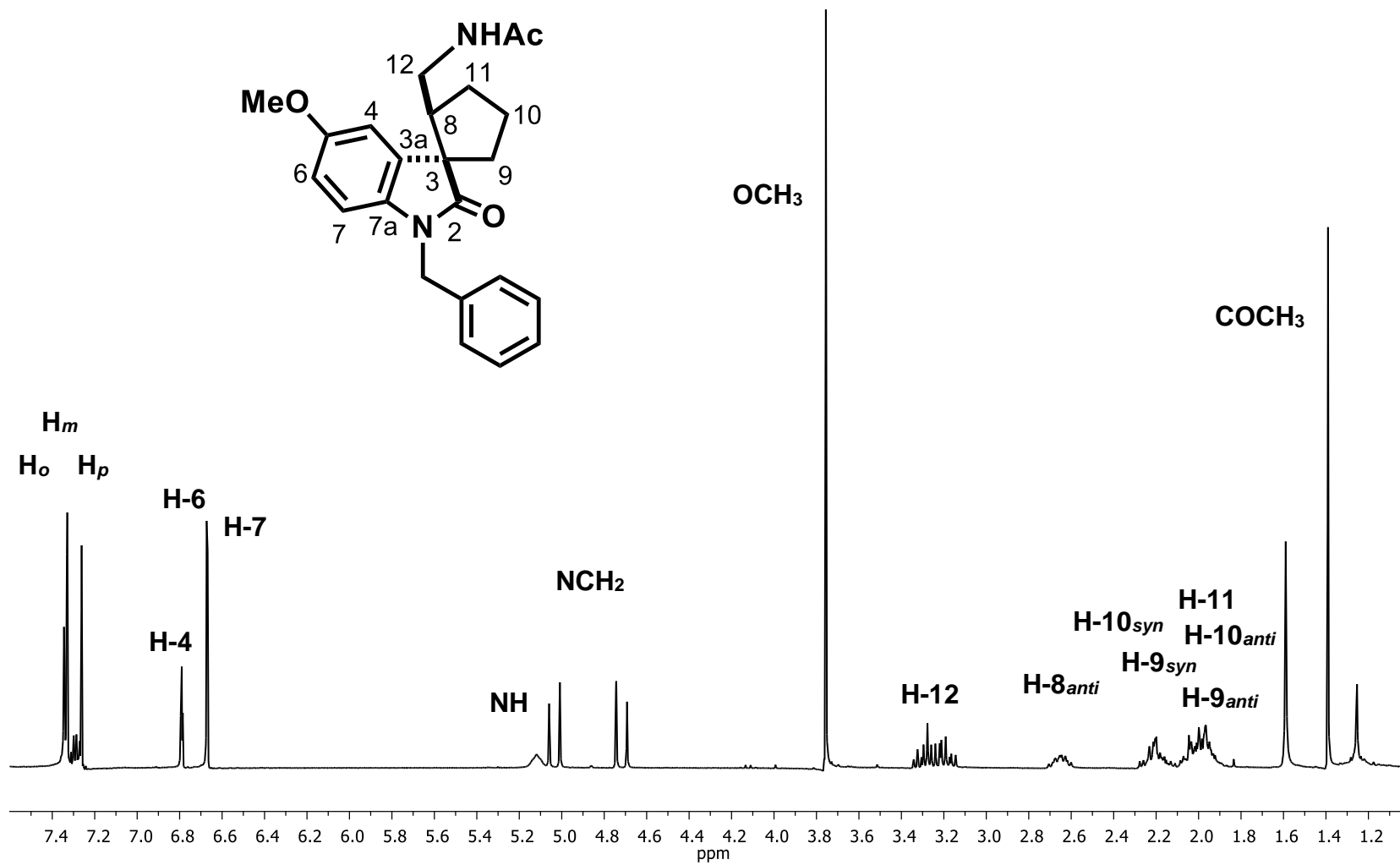


Figura 46. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de *syn*-6f en CDCl<sub>3</sub>.

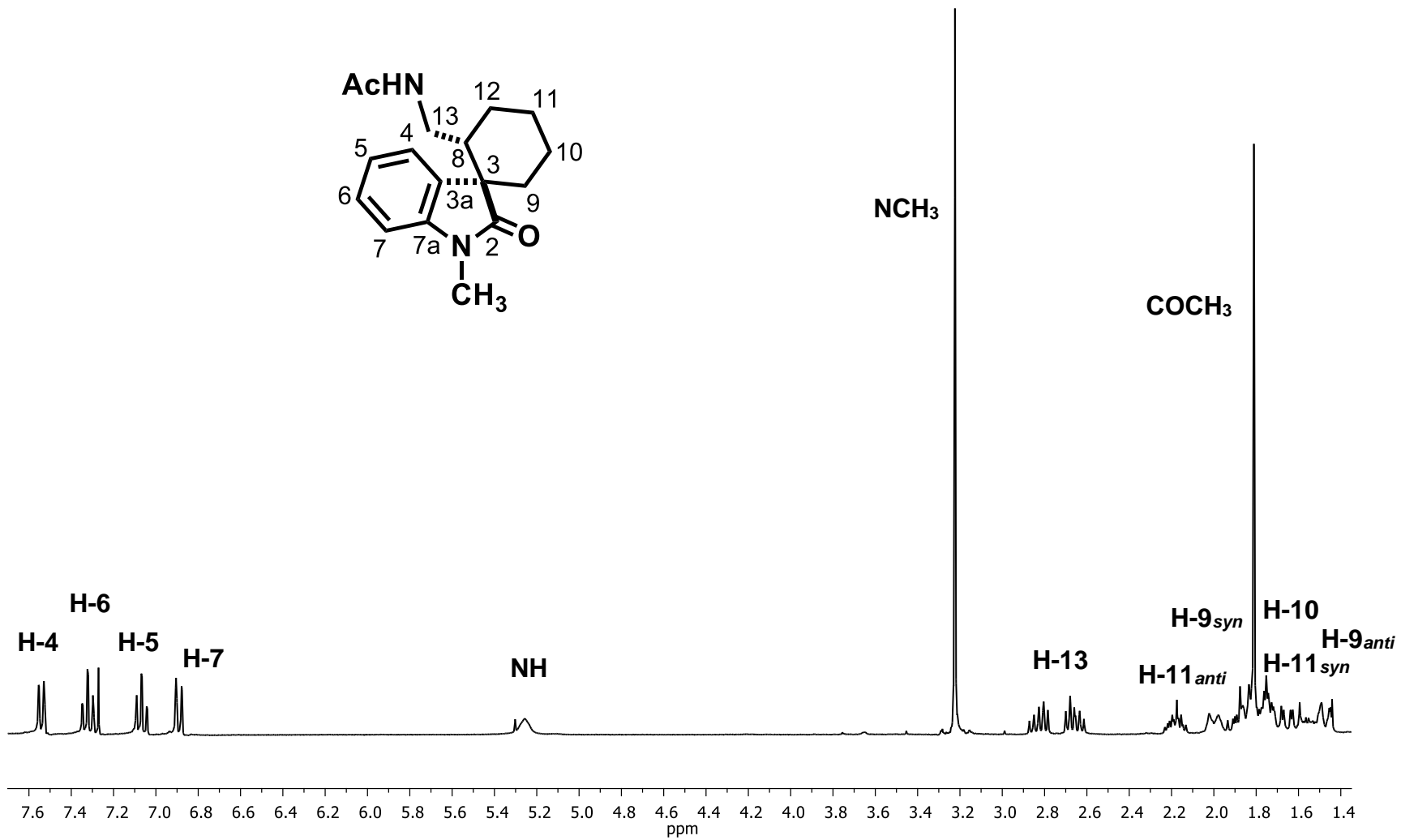


Figura 47. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de *anti*-7a en  $\text{CDCl}_3$ .

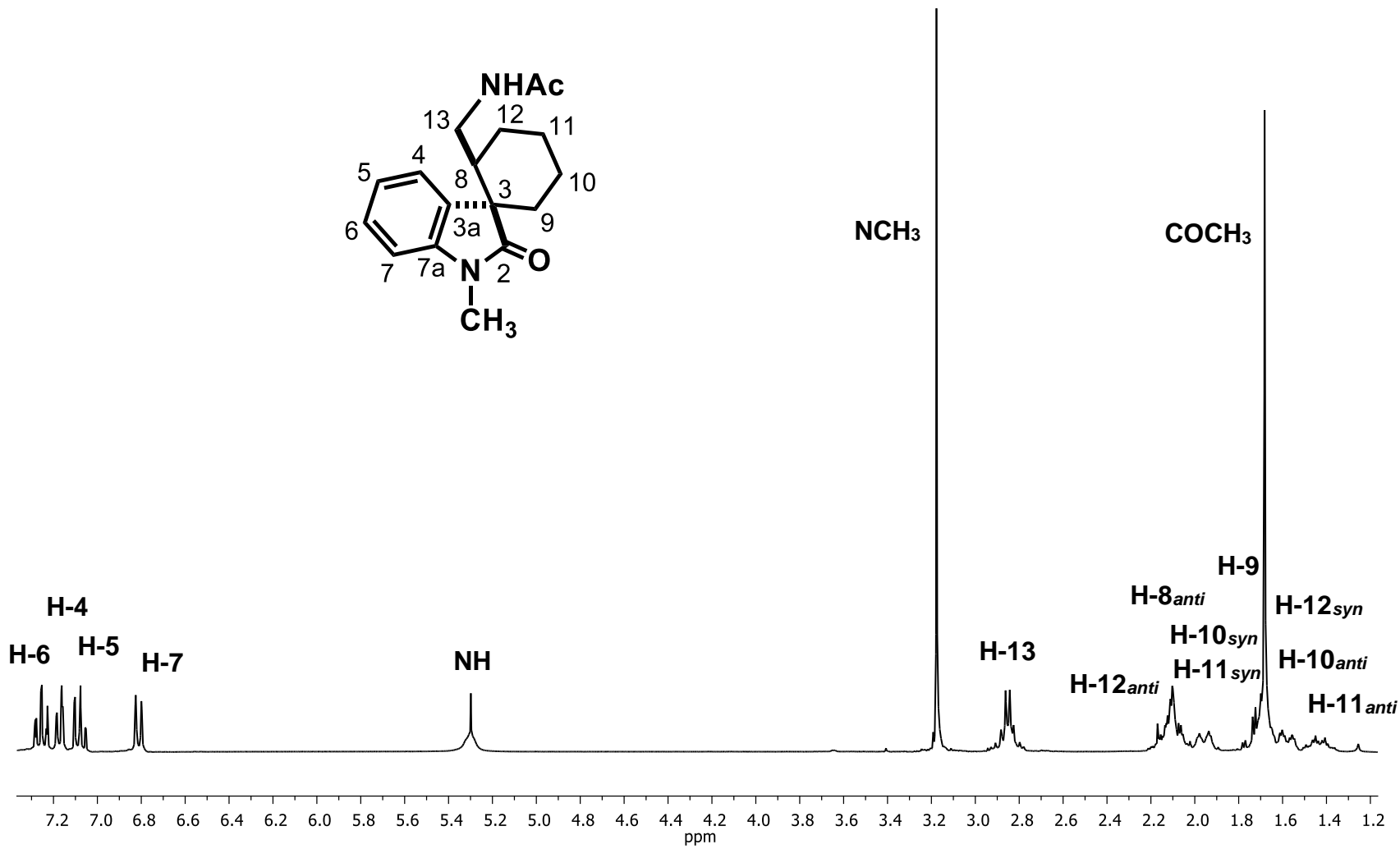
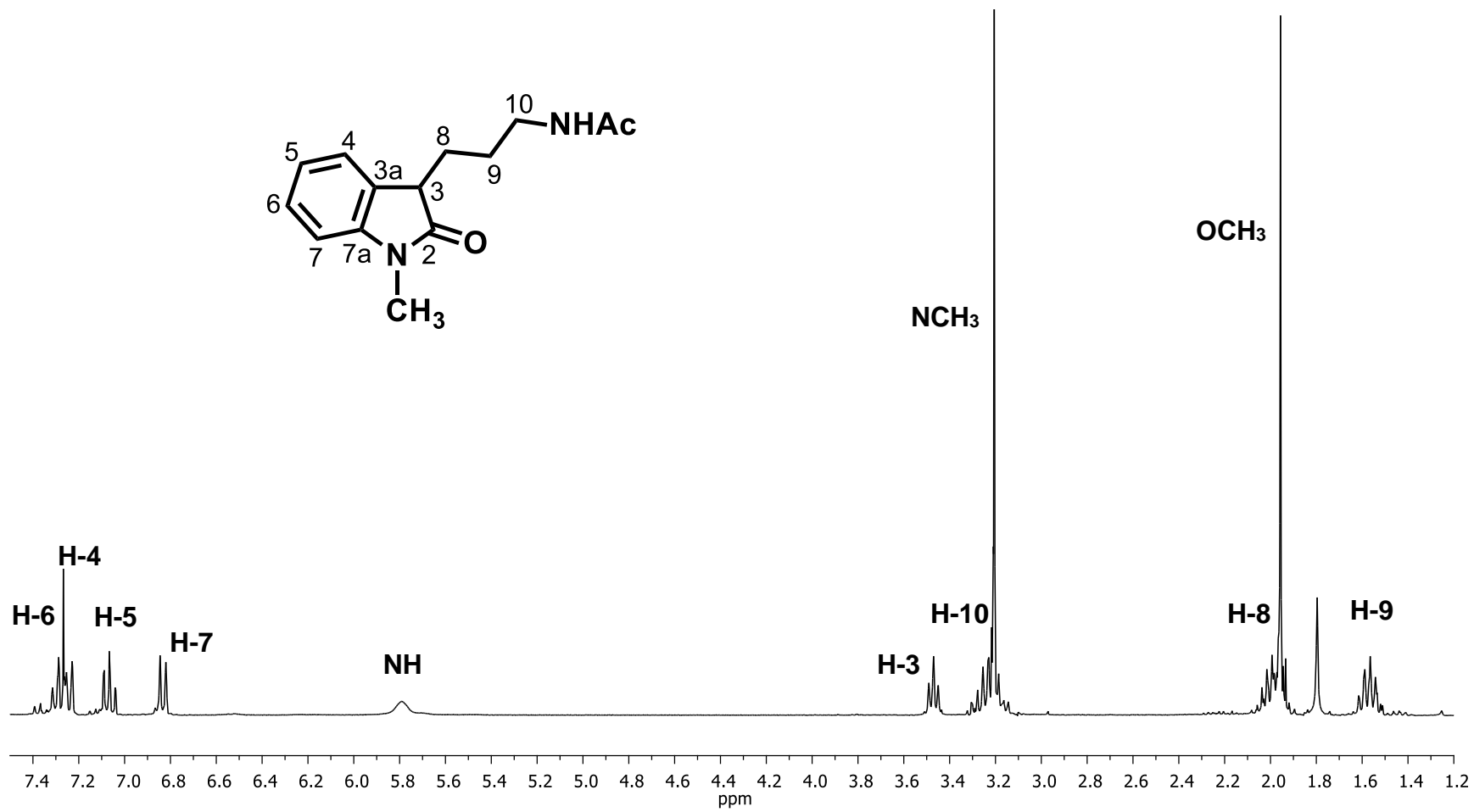
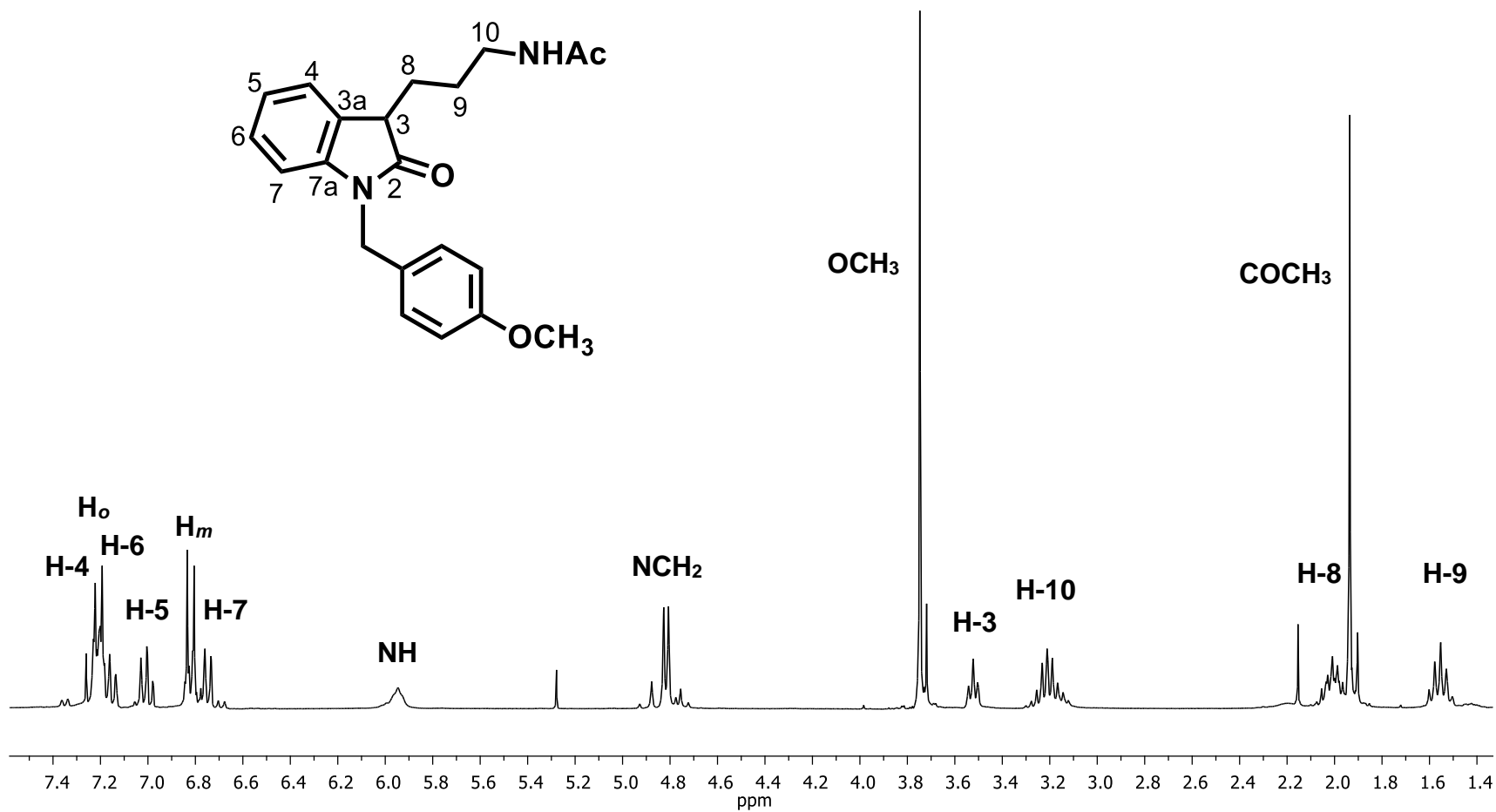


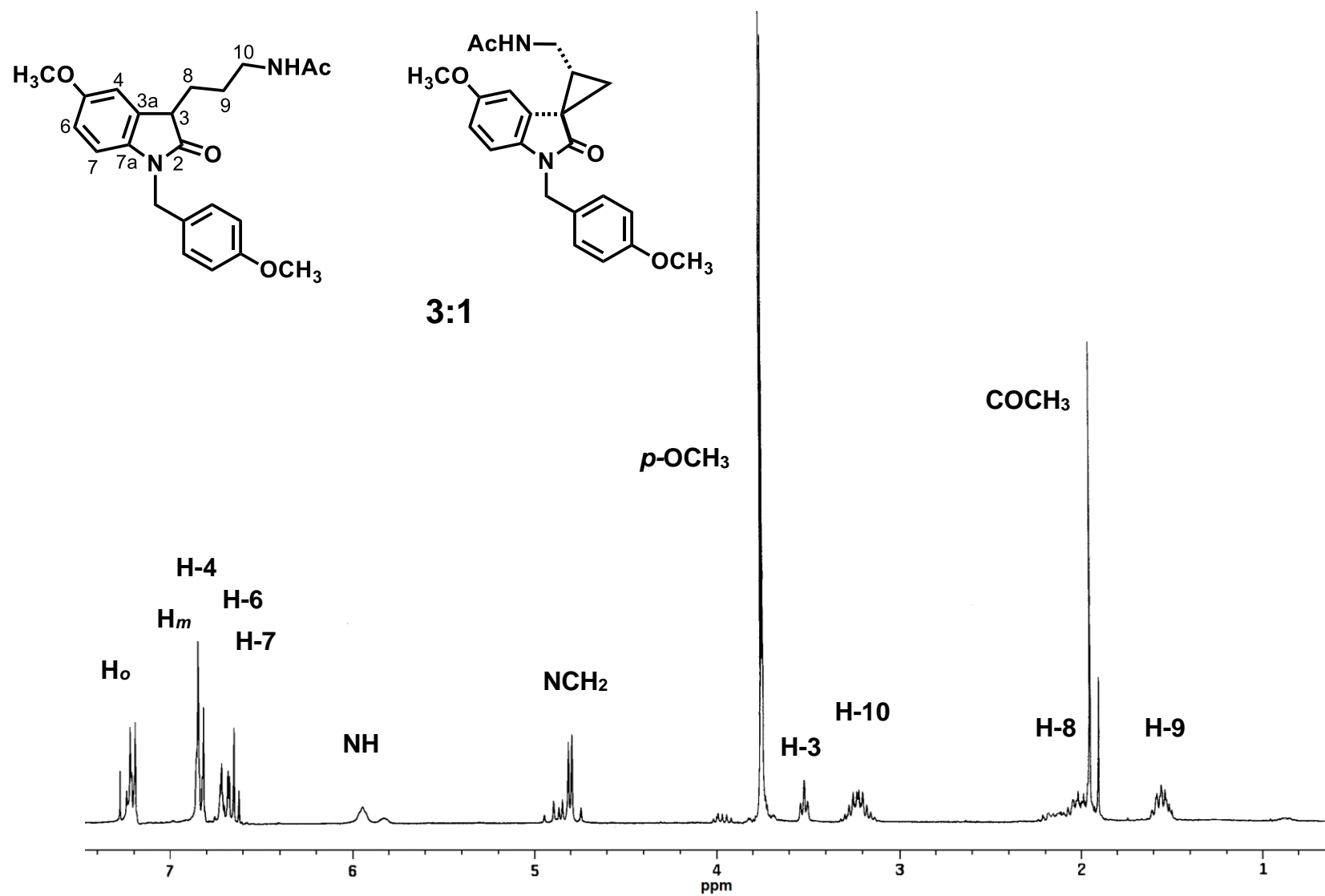
Figura 48. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de *syn-7a* en CDCl<sub>3</sub>.



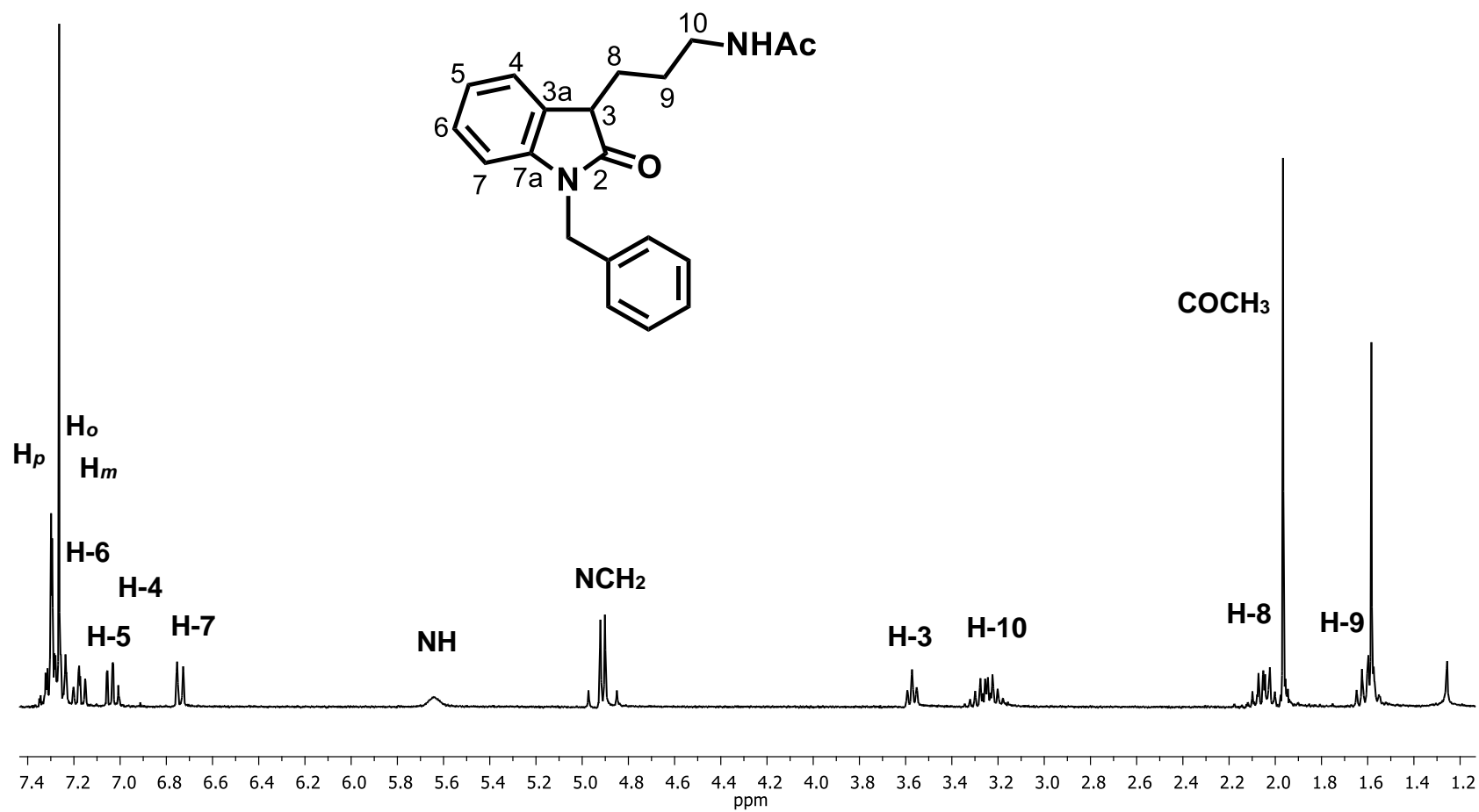
**Figura 49.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **9a** en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 50.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **9c** en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 51.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **9d** en mezcla con *anti*-**5d** en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 52.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **9e** en  $\text{CDCl}_3$ .

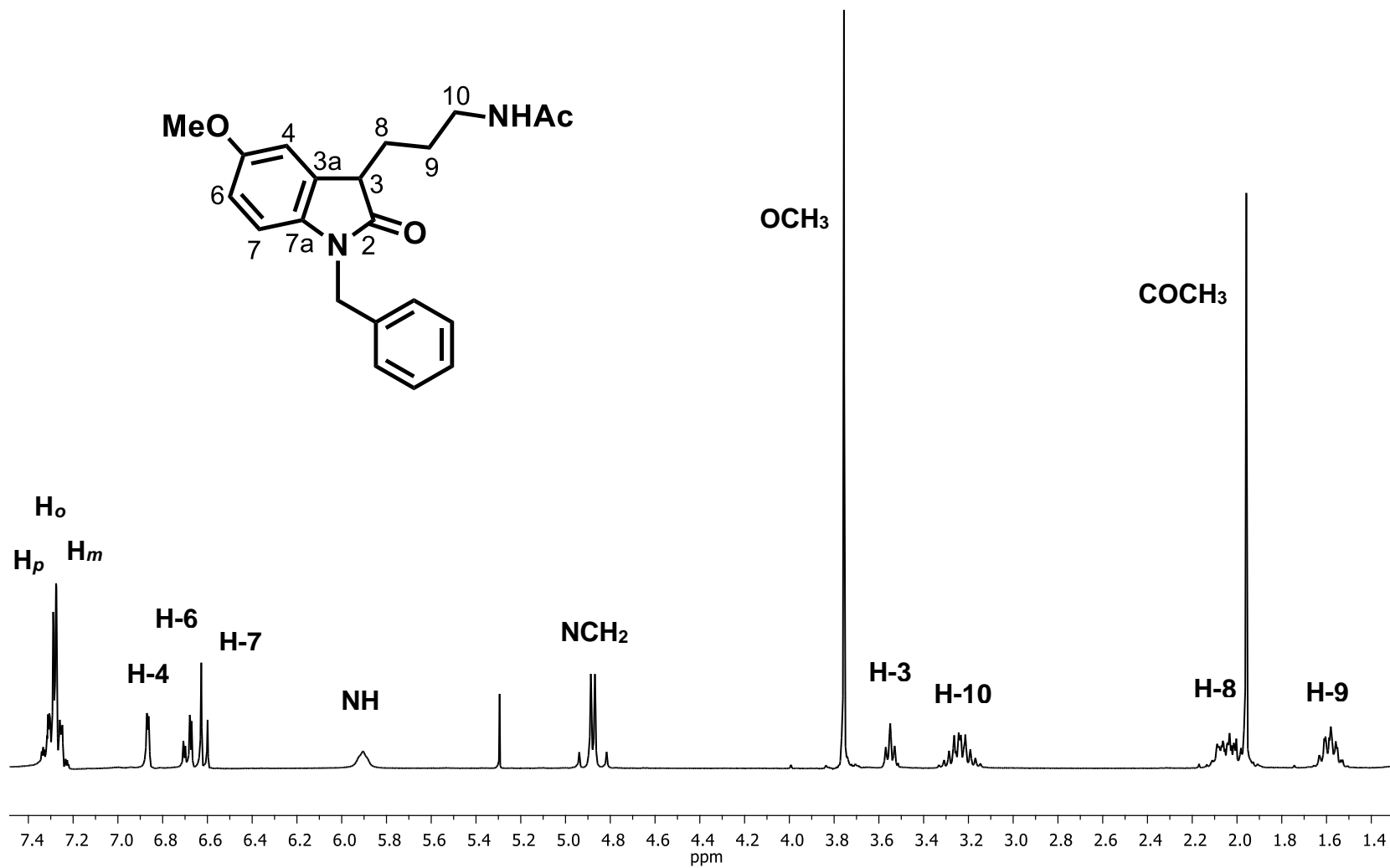


Figura 53. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **9f** en CDCl<sub>3</sub>.



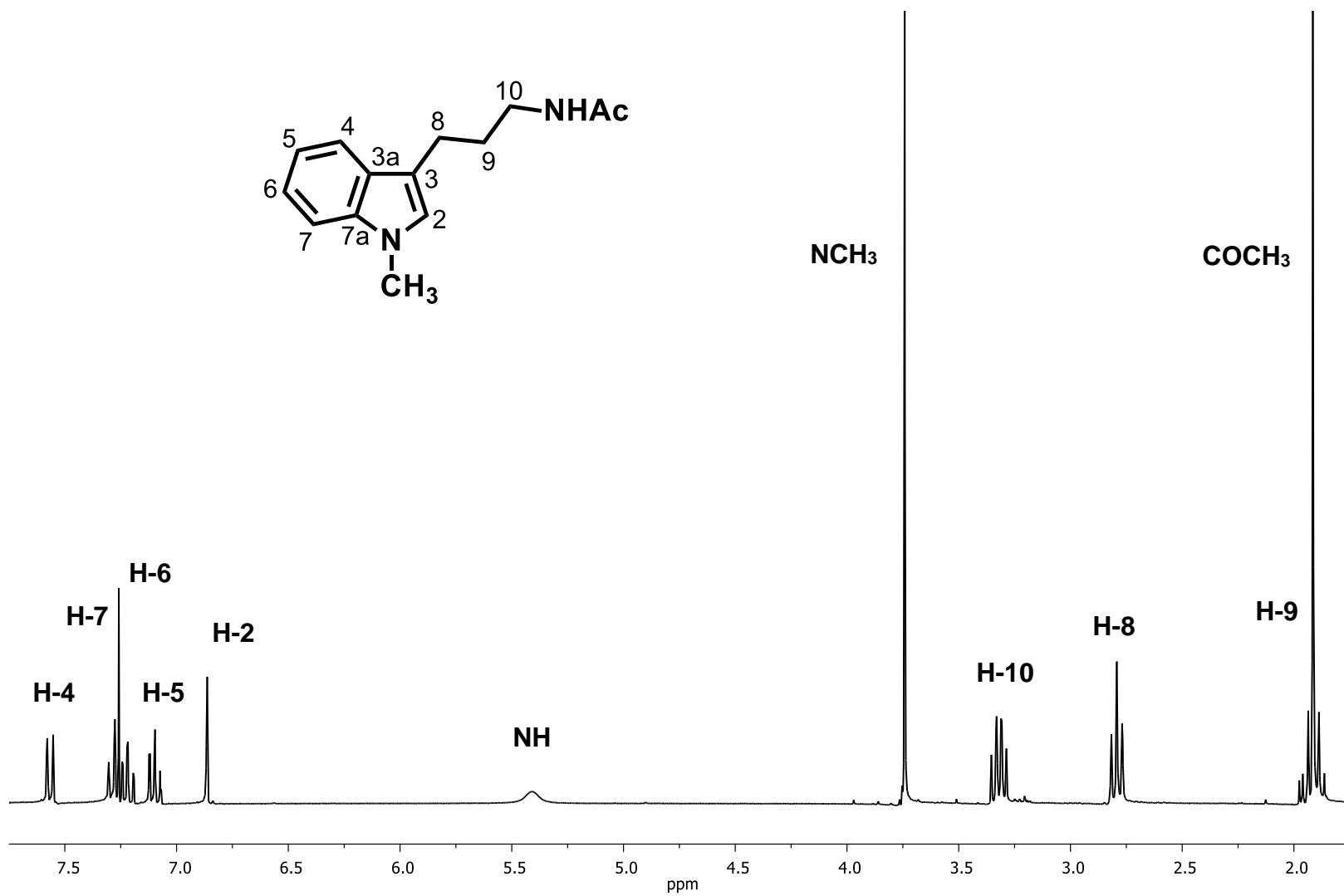


Figura 54. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 11a en CDCl<sub>3</sub>.