

# Síntesis de ácidos n-fenil y n-bencilantranílicos mediante reacción de Ullmann y evaluación de su actividad antioxidante e inhibidora de acetilcolinesterasa

Fernando A. Rojas-Ruiz, Diego R. Merchan-Arenas, Rolando F. Pellón-Comdom\* y Vladimir V. Kouznetsov.

Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Universidad Industrial de Santander, AA 678, Bucaramanga, Colombia.  
\*Facultad de Química, Laboratorio de Síntesis Orgánica, Universidad de la Habana, La Habana, Cuba. Correo electrónico: rolando.pellon@infomed.sld.cu

Recibido: 19 de mayo de 2010.

Aceptado: 25 de agosto de 2010.

Palabras clave: reacción de Ullmann, ácidos *N*-fenilantranílicos, ácidos *N*-bencilantranílicos, actividad antioxidante, inhibidores de acetilcolinesterasa, PEG 400 como medio de reacción.

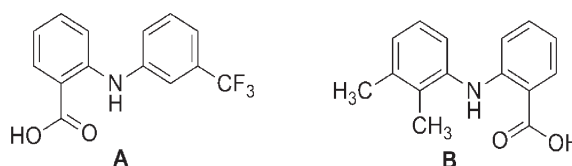
Key words: Ullmann reaction, *N*-phenylantranilic acids, *N*-benzylantranilic acids, antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibitors, PEG 400 as reaction medium.

**RESUMEN.** La reacción de un ácido 2-halogenobenzoico con aminas usando sales de cobre o cobre metálico como catalizador para obtener ácidos *N*-fenilantranílicos se conoce como la reacción de condensación de Ullmann. Se han empleado satisfactoriamente como disolventes varios alcoholes en esta reacción, de los cuales el más comúnmente usado es el alcohol isoamílico. Otros disolventes de elevado punto de ebullición como la dimetilformamida son empleados usualmente cuando se requiere de elevadas temperaturas. Sin embargo, las duras condiciones de reacción y el uso de disolventes contaminantes, llevan a severas limitaciones en el uso general de esta reacción, especialmente, en la síntesis de productos bioactivos en gran escala. Aunque el empleo del agua como disolvente en la reacción, fue un paso de avance, este procedimiento lleva en ocasiones, a largos tiempos de calentamiento debido a la capacidad calorífica del agua. En el presente trabajo, se sintetizaron ácidos *N*-fenil y *N*-bencilantranílicos mediante reacción de Ullmann modificada con rendimientos entre 55 y 90 %. Las modificaciones consistieron en el uso de PEG 400 como disolvente inocuo. Además, por primera vez se evaluó la actividad antioxidante e inhibidora de AChE del panel de moléculas obtenidas y se observó una potencial capacidad antioxidante relativa al Trolox® con valores de TEAC entre 0,81 y 2,0 y una actividad moderada de inhibición de AChE de IC<sub>50</sub> entre 12,26 y 28,62 µg/mL.

**ABSTRACT.** The reaction of 2-halogen benzoic acids with amines using copper salts or metal as catalyst in order to obtain *N*-phenylantranilic acids is known as the Ullmann condensation. Several alcohols have been satisfactorily used as solvents in this reaction of which the most commonly used is isoamyl alcohol. Other solvents of higher boiling points like dimethylformamide are usually employed when high temperatures are required. However, the harsh reaction conditions and the use of contaminant solvents, led to severe limitations in the general use of this reaction, especially in the synthesis of bioactive products on a large scale. Although the use of water as a solvent in the reaction, was a step forward, this procedure sometimes leads to long heating times due to the high heat capacity of water. In the present work, *N*-phenyl and *N*-benzylantranilic acids were synthesized by modified Ullmann reaction. Modifications consisted in use of PEG 400 as innocuous solvent. Furthermore, the antioxidant and AChE inhibition activities of the panel of molecules obtained were evaluated, showing a potential antioxidant capacity relative to Trolox® with TEAC values between 0,81 and 2,0 and a moderated AChE inhibition with IC<sub>50</sub> between 12.26 and 28.62 µg/mL.

## INTRODUCCIÓN

La síntesis de ácidos *N*-fenilantranílicos tales como los ácidos flufenámico (A), mefenámico (B) (Fig.1); ha sido objeto de atención, durante los últimos años, debido a que estos compuestos son importantes fármacos anti-inflamatorios no-esteroidales<sup>1</sup> y candidatos para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (EA).<sup>2</sup> De forma adicional,



**Fig. 1.** Ácidos fenilantranílicos sintéticos de importancia biomédica. A. Ácido flufenámico. B. Ácido mefenámico.

estos ácidos son precursores primordiales de la síntesis de acridinas<sup>3</sup> y acridonas,<sup>4</sup> con diferentes actividades biológicas.

La EA se cataloga como uno de los daños neurodegenerativos de mayor prevalencia, que afecta cerca de 200 millones de personas alrededor del mundo.<sup>5,6</sup> No obstante, en la actualidad solo un pequeño conjunto de agentes terapéuticos se encuentran disponibles y solamente tienen la habilidad de ofrecer un ligero alivio de los síntomas asociados con la enfermedad. Dentro de los diferentes medicamentos empleados en el tratamiento de la EA se destacan principalmente seis clases de moléculas: las inhibidoras de acetilcolinesterasa (AChE), antioxidantes, quelatos de metales, inhibidores de monoaminoxidasa, antiinflamatorios e inhibidores del ácido *N*-metil-D-aspartico.

Con el fin de explicar el origen de la demencia senil de Alzheimer, se han planteado diferentes hipótesis; entre ellas, se encuentran la teoría colinérgica y la formación de los fibrilos de la proteína beta-amiloide.<sup>7</sup> La hipótesis colinérgica es la más estudiada por lo que la mayoría de los medicamentos existentes en el mercado se comportan como inhibidores de la enzima AChE. Según esta hipótesis, la enzima AChE se relaciona estrechamente con la hidrólisis de acetilcolina y los cambios en las funciones cognitivas involucrados con esta enfermedad.<sup>8</sup> Sin embargo, existen evidencias de que el daño oxidativo causado a las neuronas desempeña un papel importante en la patogénesis de la EA y, por tanto, la disminución del deterioro oxidativo puede retardar o prevenir el desarrollo de esta dolencia.

Recientemente, se han realizado algunos estudios preclínicos con una gran variedad de agentes antioxidantes que podrían presentar el uso terapéutico en el tratamiento del mal de Alzheimer.<sup>9</sup> Basado en lo anterior, la síntesis de nuevos agentes inhibidores de la enzima AChE con potenciales propiedades antioxidantes, constituye una nueva perspectiva en la búsqueda de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de este tipo.<sup>10,11</sup>

Los ácidos *N*-fenilntranílicos usualmente, se preparan a partir de derivados del ácido antranílico mediante reacción con haluros aromáticos o a través del acoplamiento cruzado entre ácidos 2-halobenzoicos y arilaminas catalizado por cobre o sus sales, procesos conocidos como condensación de Ullmann.<sup>12-16</sup> Sin embargo, las condiciones clásicas de esta reacción requieren de temperaturas elevadas, disolventes tóxicos y el uso de cantidades estequiométricas de cobre lo que constituyen las principales limitaciones para su aplicación sintética. De esta forma, surge la necesidad de suplir algunas de estas limitaciones mediante la optimización de los parámetros de reacción.

El desarrollo de metodologías llevadas a cabo por diferentes grupos de investigación ha permitido mejorar las condiciones de reacción clásicas de la condensación de Ullmann<sup>17-20</sup> y abrir nuevos horizontes en la síntesis de moléculas con posibles aplicaciones terapéuticas. Estos procesos que involucran el uso de diversas bases en combinación con diferentes especies cuprosas, ligandos y temperatura permiten obtener moléculas como los ácidos *N*-fenilntranílicos con rendimientos considerables. El uso del agua como disolvente en la reacción,<sup>21,22</sup> constituyó un paso de avance, este procedimiento en ocasiones, da lugar a largos tiempos de calentamiento debido a la elevada capacidad calórica del agua con el consiguiente consumo energético, lo que provoca en ocasiones, la

necesidad de usar disolventes orgánicos muy tóxicos y de difícil eliminación como la dimetilformamida (DMF), lo cual constituye una de las características adversas en la aplicación general de esta reacción.

Actualmente, los polietilenglicoles con peso molecular promedio 400 Da (PEG 400) emergen como disolventes versátiles en reacciones orgánicas, incluyendo algunas en las cuales están involucrados compuestos organometálicos como intermediarios.<sup>23-26</sup> Gracias a las bondades presentadas por estos disolventes referidas a su carácter inocuo y su facilidad de recuperación, son considerados medioambientalmente amigables y, por consiguiente, excelentes candidatos como medio de reacción, para la modificación y optimización de los parámetros de la reacción de Ullmann. El presente trabajo propone una metodología efectiva para la obtención de derivados ácidos *N*-fenilntranílicos y ácidos *N*-bencilntranílicos mediante reacción de condensación de Ullmann, usando PEG 400 como disolvente verde y sin el uso de ligandos, como aporte a la búsqueda de nuevas estrategias para la obtención de moléculas biológicamente activas y selectivas, enfocada hacia el desarrollo de nuevos agentes antioxidantes con actividad inhibidora contra la AChE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La elucidación estructural de los compuestos sintetizados se llevó a cabo con la ayuda de métodos instrumentales. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrómetro LUMEX INFRALUM FT-02 en discos de KBr. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se registraron en un espectrómetro BRUKER Avance-400, con el empleo de cloroformo como disolvente (CDCl<sub>3</sub>) y tetrametilsilano (TMS) como referencia. Los espectros de masas se obtuvieron en un cromatógrafo de gases HP 5890A serie II, acoplado a un detector selectivo de masas HP 5972, con impacto electrónico (IE) (70 eV). Los puntos de fusión se determinaron en un fusiómetro FISHER-JHONES. Todos los reactivos y disolventes empleados en las diferentes reacciones fueron adquiridos de las casas ALDRICH, MERCK y J.T. BAKER.

Los ensayos de actividad antioxidante e inhibición de la AChE fueron realizados en un lector UV-vis, VER-SAmx, microplate reader, Molecular Device.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Síntesis

La síntesis de los ácidos *N*-fenilntranílicos **1-8** se realizó inicialmente mediante reacción de condensación de Ullmann entre diferentes anilinas con el ácido 2-clorobenzoico, con el empleo de DMF como disolvente. Esta reacción fue catalizada por CuI y en ausencia de ligando. Un estudio preliminar de la cantidad necesaria de catalizador demostró que los mejores resultados se obtenían al emplear 10 % mol de CuI respecto al ácido 2-clorobenzoico. Con el fin de aproximar las condiciones del proceso de reacción de Ullmann a los parámetros de la química sostenible y después de un análisis bibliográfico detallado, se procedió a realizar la síntesis de los ácidos (1-8), con la introducción por primera vez, del PEG 400 como disolvente en la reacción de acoplamiento cruzado catalizado por cobre. La reacción de condensación de Ullmann bajo estas condiciones permitió la síntesis de cada uno de los ácidos *N*-fenilntranílicos deseados. De manera igual, se prepararon los ácidos *N*-bencilntranílicos (**9** y **10**).

**Procedimiento general para la síntesis de ácidos *N*-fenilntranílicos 1-8 y ácidos *N*-bencilntranílicos 9 y 10**

En un reactor de 50 mL se mezclaron ácido 2-clorobenzoico (3,2 mmol), anilina o bencilamina (6,4 mmol),  $K_2CO_3$  (2,1 mmol) y CuI (I) (10 %, 2,3 mmol) en 10 mL de DMF bajo agitación vigorosa. La reacción se calentó gradualmente hasta 150 °C y se mantuvo esta temperatura durante 8 h según el seguimiento realizado por CCF. El crudo de reacción se trasvasó sobre agua (40 mL) y fue filtrado sobre celita, mientras se aciduló con HCl (1 mol/L) para su posterior extracción a pH ácido (2-3). Como disolvente de extracción se empleó acetato de etilo (2 x 30 mL). La fase orgánica fue drenada sobre  $Na_2SO_4$  y concentrada bajo presión reducida. Finalmente, el crudo fue purificado por columna cromatográfica (con el empleo como eluentes, de mezclas de éter de petróleo - acetato de etilo (5 : 1) con lo que se obtuvieron los compuestos finales (Tabla 1).

El mismo procedimiento fue seguido, empleando atmósfera inerte de nitrógeno en PEG 400 (5 mL) como medio de reacción, bajo un cierre hermético de glicerina. La proporción de catalizador fue valorada y los mejores resultados se alcanzaron con 10 % mol.

Todos los compuestos obtenidos de ambos protocolos fueron analizados por técnicas espectroscópicas y espectrométricas (IR, CG-EM,  $^1H$  y  $^{13}C$  RMN).

**Ácido 2-(fenilamino)benzoico 1.**  $R_f = 0,5$  (Éter de petróleo (EP)-acetato de etilo (AE), 1 : 1) pf. 180 - 185 °C; IR (KBr): 3 451, 3 330, 11 659, 1 583  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 12,09 (1H, s, -COOH), 9,32 (1H, s, -NH), 7,10-7,15 (4H, m, J = 7,3 Hz, 3-H), 7,31 (1H, dd, J = 7,0 y 1,6 Hz, 4-H), 7,20-7,23 (1H, d, J = 8,5 Hz, 5-H), 8,02-8,91 (1H, dd, J = 8,1 y 1,5 Hz, 6-H), 7,25 (2H, dd, J = 8,1 y 0,9 Hz, 2',(6')-H), 7,34-7,37 (2H, dd, J = 8,1 y 1,0 Hz, 3',(5')-H), 6,74-6,79 (1H, m, J = 7,5 y 0,8 Hz, 4H).  $^{13}C$  RMN (100 MHz),  $\delta$  (ppm): 173,9; 148,9; 140,4; 135,3; 132,7; 129,5; 124,2; 123,2; 117,2; 114,1; 110,5. CG;  $t_R = 18,2$  min. EM (IE) m/z (%): 213 (M+•, 65), 195 (100), 167 (50), 139 (35). Anal. Calculado:  $C_{13}H_{11}NO_2$ : C, 73,23; H, 5,20; N, 6,57; Encontrado: C, 73,01; H, 5,35; N, 6,33.

**Ácido 2-(4-metoxifenilamino)benzoico 2.**  $R_f = 10,6$  (EP : AE, 1 : 1), pf. 180 - 183 °C; IR (KBr): 3 452, 3 332, 1 661, 1 580, 2 553  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm), 11,91 (1H, s, -COOH), 9,20 (1H, s, -NH), 3,86 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 7,01 (1H, d, J = 8,5 Hz, 3-H), 7,32 (1H, ddd, J = 7,8 y 0,9 Hz, 4-H), 8,02 (1H, dd, J = 8,0 y 1,2 Hz, 6-H), 6,71 (1H, d, J = 5,1 Hz, 5-H), 8,76 (3H, d, J = 5,1 Hz, 2',5',6'-H).  $^{13}C$  RMN

(100 MHz),  $\delta$  (ppm): 173,7; 171,9; 157,03; 150,5; 135,3; 133,8; 132,9; 132,6; 130,2; 128,5; 126,4; 116,3; 114,7; 113,5. CG;  $t_R = 21,8$  min. EM (IE) m/z (%): 243 (M+•, 98), 225 (85), 210 (89), 182 (100), 154 (52), 128 (48). Anal. Calculado:  $C_{14}H_{13}NO_3$ : C, 69,12; H, 5,39; N, 5,76. Encontrado: C, 69,23; H, 5,13; N, 5,88.

**Ácido 2-(4-clorofenilamino)benzoico 3.**  $R_f = 0,7$  (EP : AE, 1 : 1), pf. 175 - 178 °C; IR (KBr): 3 464, 3 336, 1 660, 1 577  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 11,89 (1H, s, -COOH), 9,26 (1H, s, -NH), 6,75-6,82 (1H, d, J = 7,7 Hz, 3-H), 7,34-7,40 (1H, dd, J = 7,8 Hz y 1,2 Hz, 4-H), 8,02-8,08 (1H, dd, J = 8,1 y 1,1 Hz, 6-H), 7,15 (1H, d, J = 8,7 Hz, 5-H), 7,34 (2H, dd, J = 8,7 y 1,9 Hz, 2', (6')-H), 7,18 (2H, dd, J = 8,7 y 1,9 Hz, 3',(5')-H).  $^{13}C$  RMN (100 MHz),  $\delta$  (ppm): 173,6; 148,5; 139,0; 135,4; 132,7; 129,5; 129,1; 124,3; 117,7; 114,0; 110,7. CG;  $t_R = 21,5$  min. EM (IE) m/z (%): 247 (M+•, 96), 229 (100), 194 (98), 166 (78). Anal. Calculado:  $C_{13}H_{10}NO_2Cl$ : C, 63,04; H, 4,07; N, 5,66. Encontrado: C, 63,15; H, 4,20; N, 5,43.

**Ácido 2-(3,4-metilendioxfenilamino)benzoico 4.**  $R_f = 0,5$  (EP : AE, 1 : 1), pf. 178 - 182 °C; IR (KBr): 3 469, 3 340, 1 665, 1 580; 2 557  $cm^{-1}$ ,  $^1H$  RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 11,91 (1H, s, -COOH), 9,11 (1H, s, -NH), 5,99 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 7,01 (1H, 2d, J = 8,5 Hz, 3-H), 7,32 (1H, ddd, J = 7,8, y 1,0 Hz, 4-H), 8,02 (1H, dd, J = 8,0 y 1,2 Hz, 6-H), 6,71 (1H, d, J = 5,1 Hz, 5-H), 8,76 (3H, d, J = 5,1 Hz, 2',(5'),(6')-H).  $^{13}C$  RMN (100 MHz),  $\delta$  (ppm): 173,6; 150,2; 148,3; 144,9; 135,3; 134,3; 132,5; 117,9; 116,6; 113,7; 109,7; 108,6; 106,6; 101,4. CG.;  $t_R = 22,9$  min. EM (IE) m/z (%): 257 (M+•, 47), 141 (100). Anal. Calculado:  $C_{14}H_{11}NO_4$ : C, 65,37; H, 4,31; N, 5,44; Encontrado: C, 65,21; H, 4,50; N, 5,28.

**Ácido 2-(3,4-dimetoxifenilamino)benzoico 5.**  $R_f = 0,5$  (EP : AE, 1 : 1), pf. 156 - 160 °C; IR (KBr): 3 446, 3 353, 1 654, 1 513  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 12,01 (1H, s, -COOH), 9,18 (1H, s, -NH), 8,03-8,06 (1H, dd, J = 7,6 y 1,5 Hz, 6-H), 7,29-7,33 (1H, ddd, J = 7,7 y 2,9 Hz, 4-H), 7,02 (1H, dd, J = 7,9 y 3,0 Hz, 3-H), 6,69-6,73 (1H, ddd, J = 7,1 y 2,9, 5-H), 6,80-6,88 (3H, m, 2',(5'),(6')-H), 3,87 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3,90 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>).  $^{13}C$  RMN (100 MHz),  $\delta$  (ppm), 150,7; 139,0; 148,0; 134,0; 111,0; 108,8; 112,0; 116,8; 113,4; 131,2; 134,0; 118,0; 169,0; 56,0; 56,1. CG.;  $t_R = 22,2$  min. EM (IE) m/z (%): 273 (M+•, 65), 195 (100), 167 (50), 139 (35). Anal. Calculado:  $C_{15}H_{15}NO_4$ : C, 65,92; H, 5,53; N, 5,13; Encontrado: C, 65,77; H, 5,60; N, 5,25.

**Ácido 2-(2,5-dimetoxifenilamino)benzoico 6.**  $R_f = 0,7$  (EP : AE, 1 : 1), pf. 150 - 154 °C; IR (KBr): 3 450, 3 334, 1 657, 1 588  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 11,85 (1H,

**Tabla 1.** Resultados de la reacción de condensación de Ullmann en dos disolventes diferentes.

Compuesto	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	Rendimiento		Pf (°C)
					DMF	PEG 400	
1	H	H	H	H	65	55	180-185
2	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	75	65	180-183
3	H	H	Cl	H	60	55	175-178
4	H	-O-CH <sub>2</sub> -O-		H	70	65	178-182
5	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	92	90	156-160
6	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	70	60	150-154
7	CH <sub>3</sub>	Cl	H	H	68	65	180-183
8	H	Cl	H	H	60	54	175-178
9	H	H	—	—	20	20	160-163
10	H	OCH <sub>3</sub>	—	—	30	25	158-160

s, -COOH), 9,37 (1H, s, -NH), 8,06-8,08 (1H, dd,  $J = 7,8$  y  $1,5$  Hz, 6-H), 7,37-7,39 (1H, ddd,  $J = 8,0$  y  $1,6$  Hz, 4-H), 6,76-6,81 (1H, ddd,  $J = 8,3$  y  $1,6$  Hz, 5-H), 7,35 (1H, dd,  $J = 8,9$  Hz, 3-H), 7,05 (1H, d,  $J = 2,9$  Hz, 6'-H), 6,58 (1H, dd,  $J = 9,0$  y  $2,9$  Hz, 3'-H), 6,88 (1H, dd,  $J = 9,0$  y  $3,0$  Hz, 4'-H), 3,86 (3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>), 3,78 (3H, s, 5'-OCH<sub>3</sub>). (100 MHz),  $\delta$  (ppm), 150,7 139,0, 148,0 134,0, 111,0, 108,8, 112,0, 116,8, 113,4, 131,2, 134,0, 118,0, 169,0, 56,0, 56,1. CG.;  $t_R = 22,5$  min. EM (IE) m/z (%): 273 (M+•, 65), 195 (100), 167 (50), 139 (35). Anal. Calculado: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>: C, 65,92; H, 5,53; N, 5,13; Encontrado: C, 65,78; H, 5,05; N, 5,21.

**Ácido 2-(3-cloro-2-metilfenilamino)benzoico 7.** Rf = 0,7 (EP : AE, 1 : 1), pf. 180 - 183 °C; IR (KBr): 3 435, 3 342, 1 662, 1 583 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 11,09 (1H, s, -COOH), 9,23 (1H, s, -NH), 7,28-7,29 (2H, m, 3,(6')H), 7,34 (1H, ddd,  $J = 7,4$  Hz y  $1,6$ , 4-H), 6,76-6,81 (2H, m, 5,(5')-H), 7,17-7,19 (1H, dd,  $J = 8,1$  y  $1,5$  Hz, 4'-H), 8,06-8,08 (1H, dd,  $J = 8,1$  Hz y  $0,9$  Hz, 6-H), 2,36 (3H, s, 2'-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz),  $\delta$  (ppm), 173,9; 148,9; 40,4; 135,3; 132,7; 129,5; 124,2; 123,2; 117,2; 114,1; 110,5. CG.;  $t_R = 21,9$  min. EM (IE) m/z (%): 61 (M+•, 65), 195 (100), 167 (50), 139 (35). Anal. Calculado: C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>: C, 64,25; H, 4,62; N, 5,35; Encontrado: C, 64,33; H, 4,55; N, 5,29.

**Ácido 2-(3-clorofenilamino)benzoico 8.** Rf = 0,6 (EP : AE, 1 : 1), pf. 175 - 178 °C; IR (KBr): 3 463, 3 340, 1 665, 1 578 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 11,90 (1H, s, -COOH), 9,35 (1H, s, -NH), 7,27-7,29 (3H, m, 2',(3),(6')-H), 7,38-7,43 (1H, ddd,  $J = 8,8$  y  $1,3$  Hz, 4-H), 8,05-8,08 (1H, dd,  $J = 8,1$  y  $1,3$  Hz, 6-H), 6,80-6,84 (1H, ddd,  $J = 8,8$  y  $0,91$  Hz, 5-H), 7,13-7,15 (1H, dd,  $J = 7,9$  y  $1,3$  Hz, 4'-H), 7,06-7,09 (1H, dd,  $J = 7,9$  y  $1,3$  Hz, 5'-H). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz),  $\delta$  (ppm): 173,6; 148,5; 139,0; 135,4; 132,7; 129,5; 129,1; 124,3; 117,7; 114,0; 110,7. CG.;  $t_R = 21,5$  min. EM (IE) m/z (%): 247 (M+•, 96), 229 (100), 194 (98), 166 (78). Anal. Calculado: C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>ClNO<sub>2</sub>: C, 63,04; H, 4,07; N, 5,66; Encontrado: C, 70,15; H, 5,67; N, 5,32.

**Ácido 2-(bencilamino)benzoico 9.** Rf = 0,5 (EP : AE, 1 : 1), pf. 160 - 163 °C; IR (KBr): 3 451, 3 373, 1 666, 1 577, 2 555 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 12,09 (1H, s, -COOH) d, 6,62 (1H, s, -NH), 4,50 (2H, s,  $J = 7,3$  Hz, -CH<sub>2</sub>), 8,13 (1H, dd,  $J = 7,3$  y  $1,0$  Hz, 6-H), 6,65 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz, 5-H), 8,02 (1H, dd,  $J = 8,1$  y  $1,0$  Hz, 3-H), 7,49 (1H, d,  $J = 7,8$ , 4H), 7,32-7,37 (5H, m, 2'-(6')-H). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz):  $\delta$  (ppm): 190,5; 160,3; 159,6; 152,2; 150,5; 136,5; 133,6; 132,2; 132,1; 128,3; 127,6; 123,2; 120,7; 120,0; 119,4; 106,2. CG;  $t_R = 22,9$  min. EM (IE) m/z (%): 227 (M+•, 47), 136 (100), 91 (60). Anal. Calculado: C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: C, 73,99; H, 5,77; N, 6,16; Encontrado: C, 73,75; H, 5,89; N, 6,01.

**Ácido 2-(4-metoxibencilamino)benzoico 10.** Rf = 0,6 (EP : AE, 1:1), pf. 158 - 164 °C; IR (KBr): 3 451, 3 375, 1 659, 1 578, 2 555 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz),  $\delta$  (ppm): 11,30 (1H, s, -COOH) 6,62 (1H, s, -NH), 3,79 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4,40 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 7,99-8,03 (2H, m, 6 y 3-H), 7,45-7,49 (2H, m, 4 y 5-H), 7,27 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz, 2',(6')-H), 6,88 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz, 3',(5')-H). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz)  $\delta$  (ppm): 190,5; 160,3; 159,6; 152,2; 150,5; 136,5; 133,6; 132,2; 132,1; 128,3; 127,6; 123,2; 120,7; 120,0; 119,4; 106,2. CG;  $t_R = 25,4$  min. EM (IE) m/z (%): 257 (M+•, 50), 226 (35), 91 (60), 136 (98). Anal. Calculado: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>: C, 70,02; H, 5,88; N, 5,44; Encontrado: C, 70,15; H, 5,67; N, 5,32.

## Ensayos biológicos

### Estudio de la capacidad antioxidante relativa al Trolox®

El estudio de la potencial actividad antioxidante (AO) de los ácidos preparados (1-10) fue realizado mediante el procedimiento descrito por Re y col.<sup>27</sup> Esta metodología fue modificada en función de optimizar costos y tiempo.

Para la preparación del catión-radical ABTS+•, se utilizaron 3,34 mg de peroxodisulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), 19,60 mg de ABTS+• y la mezcla se aforó con agua grado HPLC. La disolución se dejó reaccionar durante 16 h a bajas temperaturas (< 15 °C) y en ausencia de luz.

Para las sustancias a evaluar se prepararon disoluciones patrones de 1 · 10<sup>-3</sup> mol/L, las cuales se diluyeron hasta que, después de introducir alícuotas de 10  $\mu$ L de estas disoluciones a las nuevas disoluciones de ABTS+• (200  $\mu$ L), se produjeran disminuciones entre el 20 y 80 % de la absorbancia del blanco. El porcentaje de inhibición medido a los 30 min se graficó como una función de la concentración evaluada. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y para el cálculo del TEAC se utilizó la relación entre las concentraciones inhibitoras al 50 % (IC<sub>50</sub>) de Trolox® y las sustancias evaluadas.

### Estudio de inhibición *in vitro* de la acetilcolinesterasa

De acuerdo con el procedimiento descrito por Ellman,<sup>28</sup> se colocaron 50  $\mu$ L de una disolución del compuesto a probar (en concentraciones seriadas desde 1 · 10<sup>-3</sup> hasta 1 · 10<sup>-7</sup> mol/L), disuelto en disolución estabilizadora fosfato salina de pH 7.5 y 50  $\mu$ L de la AChE (0,25 U/mL). La placa se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se adicionaron 100  $\mu$ L de la disolución sustrato de pH 7,5 [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,04 mol/L, ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico 0,2 mmol/L, yoduro de acetiltiocolina 0,24 mmol/L]. A los cinco minutos de iniciada la reacción, se determinó la absorbancia a 412 nm en un lector de microplacas VERSAmax. Se usaron galantamina y fisostigmina como compuestos de referencia. Los ensayos se realizaron por triplicado y los cálculos de las IC<sub>50</sub> y las gráficas se realizaron con el programa SoftMax Pro 5.2 de Molecular Devices, USA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis

La síntesis de los ácidos *N*-fenilntranílicos y *N*-bencilntranílicos (1-10) se realizó mediante la reacción de condensación de Ullmann modificada entre el ácido 2-clorobenzoico y las correspondientes anilinas y bencilaminas en presencia del catalizador CuI (10 % mol) (Fig. 2). Con la introducción del PEG 400 como disolvente en la reacción de condensación de Ullmann fue posible sintetizar los ácidos *N*-fenilntranílicos (1-8) con rendimientos entre 55 y 90 % (Tabla 1).

Aunque los rendimientos obtenidos no superaron los presentados al usar DMF como disolvente, si demostraron la robustez de esta reacción como herramienta sintética para la formación de unidades diarilamina. El uso del PEG 400 puede imprimir un efecto favorable en la reacción de condensación de Ullmann mediante el incremento de la solubilidad de la especie de cobre, lo cual se revela en el uso de cantidades catalíticas de Cu, sin requerir el uso de ligandos estabilizadores de la especie de cobre,<sup>29,30</sup> además del efecto favorable para el medio ambiente.

La *N*-arilación de bencilaminas con el empleo del ácido 2-clorobenzoico, bajo la metodología establecida e introduciendo PEG 400 como disolvente en la reacción de acoplamiento cruzado catalizado por yoduro de cobre, permitió la síntesis de los ácidos *N*-bencilntranílicos (9 y 10) con modestos rendimientos entre el 20 y 25 % (Tabla 1). Cabe notar que la obtención convencional de este tipo de los ácidos se consigue empleando los mismos precursores en presencia del cobre o del sistema Cu/Cu<sub>2</sub>O en un disolvente orgánico (DMF o 2-etoxietanol).<sup>18,31</sup> La estructura de todos los compuestos (1-10) se confirmó

por un conjunto de métodos físico químicos (IR, CG-EM,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN).

### Ensayos biológicos

Los resultados de la actividad antioxidante, demuestran una potencial bioactividad, con valores de TEAC entre 0,3 y 2,0 para los ácidos sintetizados. Existe una relación directa entre la naturaleza de sustituyentes del fragmento anilínico y la capacidad antioxidante relativa al Trolox®, encontrando los ácidos *N*-fenilantranílicos (4-7) con grupos metoxilo, metilo y metilendioxi, los que presentan potente actividad, mientras que el compuesto (8) (sustituyente cloro) es el peor antioxidante. Según los resultados correspondientes a los ácidos sintetizados, se observó una potencial inhibición de la AChE y se registraron valores de  $\text{IC}_{50}$  entre 12 y 28  $\mu\text{g/mL}$  por lo que los ácidos *N*-fenilantranílicos (1-8) resultaron mejores frente a los *N*-bencilderivados (9 y 10) (Tabla 2). En general, la presencia de sustituyentes metoxilo, metilo y cloro tiene un efecto negativo sobre la actividad de acuerdo con su posición, como se observa en los compuestos 5-8, sustituidos en posiciones orto y meta respecto al grupo amino.

### CONCLUSIONES

Se demostró que el uso del PEG 400 como medio de reacción de Ullmann es viable, efectivo y favorable a la química sostenible. Al analizar la actividad antioxidante (capacidad en TEAC) e inhibidora contra la AChE de la serie de ácidos *N*-arilantranílicos se encontraron compuestos (4-7) de importancia para posteriores desarrollos sintéticos y estudios fármaco-biológicos.

### AGRADECIMIENTOS

El laboratorio de química orgánica y biomolecular (LQOBio) agradece a COLCIENCIAS-CENIVAM (contrato 432-2004) por la ayuda financiera.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lopez C, Bracht A, Yamamoto N, Ishii-Iwamoto E, Sampaio E, Kelmer-Bracht A. The action of flufenamic acid and other nonsteroidal anti-inflammatories on sulfate transport in the isolated perfused rat liver. *Gen Pharm.* 1999;32:713-720.
- Altman, HJ, Alzheimer's Diseases Problems, Prospects and Perspectives. New York: ed. Plenum Press: 1987.
- Acheson RM. Acridines. The Chemistry of Heterocyclic Compounds, ed. Interscience Publishers Inc: New York: 1956.
- Michael JP. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2005;22:627-646.
- Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science.* 2006;314:777-781.
- Roberson ED, Mucke L. 100 Years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* 2006;314:781-784.
- Suh YH, Checler F. Effects of carboxyl-fragment of Alzheimer's amyloid protein and amyloid beta-peptide on the production of cytokines and nitric oxide in glial cells. *Pharmacol Rev.* 2002;54:469-525.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Disc.* 2004;3:205-214.
- Won HS, Kenneth S, Yoo-Hun S. Therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Curr Med Chem-Central Nervous System Agents.* 2005;5:259-269.
- Fang L, Kraus B, Lehmann J, Heilmann J, Zhang Y, Decker M. Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18:2905-2909.
- Rodríguez-Franco MI, Fernández-Bachiller MI, Pérez C, Hernández-Ledesma B, Bartolomé B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J Med Chem.* 2006;49:459-462.
- Hassan J, Sevignon M, Gozzi C, Schulz E, Lemaire M. Aryl-aryl bond formation one century after the discovery of the Ullmann reaction. *Chem Rev.* 2002;102:1359-1369.
- Steven V, Thomas W. Modern synthetic methods for copper-mediated C(aryl)-O, C(aryl)-N, and C(aryl)-S bond formation. *Angew Chem.* 2003;42:5400-5449.
- Beletskaya IP, Cheprakov V. Copper in cross-coupling reactions. The post-Ullmann chemistry. *Coordination Chem Rev.* 2004;248:2337-2364.
- Kunz K, Scholz U, Ganzer D. Renaissance of Ullmann and Goldberg reactions - Progress in copper catalyzed C-N-, C-O- and C-S-coupling. *Synlett.* 2003;2428-2439.
- Evano G, Blanchard N, Toubi M. Copper-mediated coupling reactions and their applications in natural products and designed biomolecules synthesis. *Chem Rev.* 2008;108:3054-3131.
- Sperotto E, Vries J, Van Klink G, Van Koten G. Ligand-free copper(I) catalyzed N- and O-arylation of aryl halides. *Tetrahedron Lett.* 2007;48:7366-7370.
- Wolf C, Liu S, Mei X. Regioselective copper-catalyzed amination of bromobenzoic acids using aliphatic and aromatic amines. *J Org Chem.* 2006;71:3270-3273.
- Bueno A, Silva L, Correa G. Microwave-promoted synthesis of novel *N*-arylantranilic acids. *J Braz Chem Soc.* 2008;19:1264-1269.

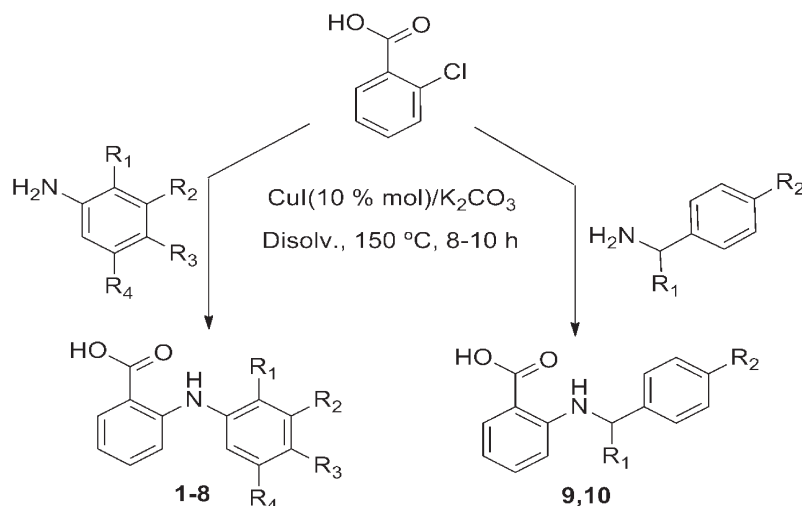
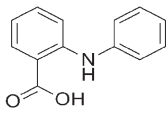
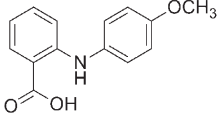
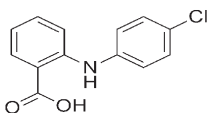
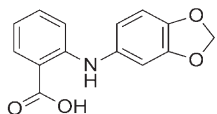
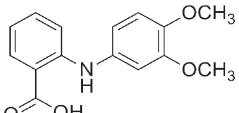
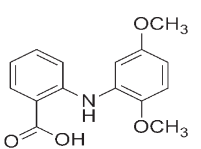
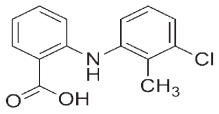
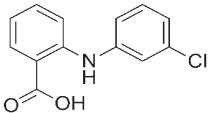
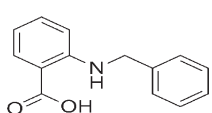
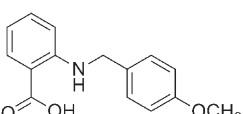


Fig. 2. Síntesis de ácidos *N*-arilantranílicos 1-10 a través de condensación de Ullmann.

**Tabla 2.** Resultados biológicos de los compuestos (1-10): actividad antioxidante (TEAC) e actividad inhibidora contra AChE.

Compuesto	Estructura	IC <sub>50</sub> (μg/mL)		TEAC <sup>1</sup>	
		Promedio	DS (%)	Promedio	DS (%)
1		12,26 ± 0,45	0,752	< 0,05	
2		17,51 ± 0,01	0,389	0,81 ± 0,003	0,351
3		12,91 ± 0,22	3,108	< 0,05	
4		18,75 ± 0,07	0,128	1,71 ± 0,001	0,067
5		26,21 ± 0,41	0,798	1,13 ± 0,001	0,097
6		24,11 ± 0,21	0,909	2,00 ± 0,001	0,046
7		24,56 ± 0,09	0,030	1,52 ± 0,000	0,095
8		25,95 ± 0,02	1,726	0,30 ± 0,000	0,025
9		23,27 ± 0,40	0,284	0,96 ± 0,000	0,013
10		28,62 ± 0,07	1,439	0,73 ± 0,000	0,038
Galantamina	---	0,30 ± 0,00	0,004	-----	-----
Diazinón	---	0,58 ± 0,00	0,015	-----	-----
BHA <sup>2</sup>	---	-----	-----	1,02 ± 0,040	0,001
Vitamina E	---	-----	-----	0,89 ± 0,050	0,015

<sup>1</sup> IC<sub>50</sub> Compuesto/IC<sub>50</sub> Trolox<sup>®</sup>. <sup>2</sup> 4-Metoxi-2-t-butilfenol.

20. Martín A, Mesa M, Docampo ML, Gómez V, Pellón RF. Fast Synthesis of substituted N-phenylanthranilic acids using Ullmann condensation under microwave irradiation in dry media. *Synth Commun.* 2006;36:271-277.
21. Pellón RF, Carrasco R, Rodés L. Synthesis of N-phenylanthranilic acids using water as solvent. *Synth Commun.* 1993;23:1447-1453.

22. Pellón RF, Estévez A, Docampo ML, Martín A, Gutiérrez A. Use of ultrasound in the synthesis of 2-(alkylamino)benzoic acids in water. *Synlett.* 2005;1606-1608.
23. Mao J, Guo J, Fang F, Ji SJ. Highly efficient copper(0)-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions in reusable PEG-400. *Tetrahedron.* 64, 2008;3905-3911.

24. Kouznetsov V, Merchan D, Romero A. PEG-400 as green reaction medium for Lewis acid-promoted cycloaddition reactions with isoeugenol and anethole. *Tetrahedron Lett.* 2008;49:3097-3100.
25. Li J, Hu X, Liang Y, Xie X. PEG-400 promoted Pd(OAc)<sub>2</sub>/DABCO-catalyzed cross-coupling reactions in aqueous media. *Tetrahedron.* 2006;62:31-38.
26. Kobedetic R, Pembrovic V. Selective reduction of cyclohexanes with NaBH<sub>4</sub> in Beta-cyclodextrin, PEG 400 and micelles. *Supramol Chem.* 2008;20:379-385.
27. Re R, Pellegrini N, Protagente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Bio Med.* 1999;26:1231-1237.
28. Ellman G, Courtney K, Andres JrV, Robert MF. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
29. Weingarten H. Mechanism of the Ullmann condensation. *J Org Chem.* 1964;29:3624-26.
30. Lindley J. Copper assisted nucleophilic substitution of aryl halogen. *Tetrahedron.* 1984;40:1433-1456.
31. Pellón RF, Carrasco R, Márquez T, Mamposo T. Use of N,N-dimethylformamide as solvent in the synthesis of N-phenylanthranilic acids. *Tetrahedron Lett.* 1997;38:5107-5110.