

Universidad de Guanajuato



Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Posgrado en Ciencias Químicas

“Síntesis y evaluación de compuestos fluorescentes como sensores y marcadores biológicos.”

Tesis

Que para obtener el título de
Doctor en Ciencias Químicas

Presenta:

QFB. Santiago García Mares.

Asesor:

Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara.

Co-asesor:

Dra. Yolanda Alcaraz Contreras.

“Knowing is not enough; we must apply. Willing is not enough; we must do it.”

— Johann Wolfgang von Goethe

“Research is what I’m doing when I don’t know what I’m doing.”

— Wernher von Braun

PRODUCTOS

Del desarrollo de este trabajo, se han obtenido los siguientes productos:

- **Congresos:**

-QFB. Santiago García; Dr. Alberto Flores Martínez; Dr. Francisco Delgado Reyes; Dr. Juvencio Flores García; Q. Tayde Osvaldo Villaseñor Granados; Dra. Yolanda Alcaraz Contreras; Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara, "Síntesis de compuestos con núcleo cumarin-triazol y su aplicación como antifúngicos" *49° Congreso Mexicano de Química, SQM A.C.*; Mérida, Yucatan, Septiembre **2014**.

-QFB. Santiago García; Dra. Minerva Alfaro Martínez; Dra. Yolanda Alcaraz Contreras; Dr. Juvencio Robles García; Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara, "Síntesis de pirroles y su evaluación como anticancerígenos" *17° Seminario de Investigación, Aguascalientes, Ags.* Mayo **2016**.

-S. García; F. López; L. Bahena; Y. Alcaraz; J. Robles; M. Vazquez, "Synthesis and Docking studies of a new family of coumarin-based hydroxamic acids" *17th TETRAHEDRON SYMPOSIUM, España, Sitges*, Junio **2016**.

-Santiago García; Fernando Hernández-Borja; Luis Baena; Itzel Mercado; Marco A. García-Revilla; Yolanda Alcaraz; Juvencio Robles; David Ordaz; Nancy Santos; Rocío Ángeles García Becerra; Miguel A. Vazquez, "Derivados De ácido hidroxámico alquil-cumarina como inhibidores HDAC" *52° CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA, SQM A.C.*; Puerto Vallarta, Jalisco, Septiembre **2017**.

- **Publicaciones:**

[1] Santiago García; Juan L. Vázquez; Marvin Rentería; Isis G. Aguilar-Garduño; Francisco Delgado; Mónica Trejo-Durán; Marco A. García-Revilla; Edgar Alvarado-Méndez, Miguel A. Vázquez, "Synthesis and experimental-computational characterization of nonlinear optical properties of triazacyclopentafluorene-coumarin derivatives." *Opt. Mater. (Amst)*, **2016**, 62, 231-239, doi: <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2016.09.065>

[2] Tayde Villaseñor-Granados; S. García; Miguel A. Vazquez; Juvencio Robles, "Molecular docking-based screening of newly designed coumarin derivatives with potential antifungal activity against lanosterol 14 α -demethylase." *Theor. Chem. Acc.*, **2016**, 135, 1-16. doi: <https://doi.org/10.1007/s00214-016-1965-y>

[3] Santiago García; Karla Armendariz; Tayde Villaseñor-Granados; Patricia Ponce-Noyola; Alberto Flores; José Ascención Martínez-Álvarez; Marco A. García-Revilla; Juvencio Robles; Yolanda Alcaraz; Miguel A. Vázquez, "Synthesis, biological evaluation and docking study of possible antifungal compounds with a coumarin-containing triazole side chain." *J. Mex. Chem. Soc.*, **2019**, 63, 103-119. doi: <http://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v63i1.751>

[4] Santiago García; Miguel A. Vazquez; Itzel Mercado; Luis Bahena; Yolanda Alcaraz; Marco A. García-Revilla; Juvencio Robles; Nancy Santos-Martínez; David Ordaz-Rosado; Rocío García-Becerra, "Design of Fluorescent Coumarin-Hydroxamic Acid Derivatives as Inhibitors of HDACs: Synthesis, Biological Activity and *Docking* Studies." *Anti-cancer Agents in Med. Chem.*, **2019**, *In revision*.

- **Patentes:**

1.- Miguel Ángel Vazquez Guevara, Marvin Rentería Gómez, Santiago García Mares, Fabiola Noemí de la Cruz Duran, Edgar Alvarado Méndez, Yolanda Alcaraz Contreras, Patente otorgada MX/a/2013/01469 de nombre "Híbridos de Cumarin-3-(benzo-imidazo-indolizina) con propiedades de óptica no lineal " Universidad de Guanajuato, Departamento de Química, Guanajuato Gto., en **2018**.

2.- Miguel Ángel Vazquez Guevara, Alberto Flores Martínez, Juvencio Robles García, Yolanda Alcaraz Contreras, Santiago García Mares, Fabiola Noemí de la Cruz Duran, Tayde Osvaldo Villaseñor Granados, Julio César López Martínez, Patente otorgada MX/a/2014/014695 "Moléculas Orgánicas con núcleo base de cumarina con actividad antifúngica " Universidad de Guanajuato, Departamento de Química, Guanajuato Gto., en **2018**.

3.- Erick Iván Velazco Cabral, Miguel Ángel Vazquez Guevara, Yolanda Alcaraz Contreras, Alfonso Trujillo Valdivia, Santiago García Mares, Aplicación para el registro de patente con el nombre "Uso del extracto de *Chrysanthemum spp.* y Gioia Meillan para la absorción de la radiación UV, bloqueo de radicales libres en la piel y tratamiento de la rosácea" Universidad de Guanajuato, Departamento de Química, Guanajuato Gto., en **2017**.

- **Reconocimientos:**

-1er lugar en el 8° concurso de creatividad e innovación por parte de la Universidad de Guanajuato, proyecto de invención nivel Licenciatura con el Proyecto "Derivados de cumarin-imidazo-indolizina con propiedades no lineares".

-2o lugar en el 9° concurso de innovación en 2014 por parte de la Universidad de Guanajuato, Proyecto de Invención nivel Licenciatura con el Proyecto "Derivados de cumarina con actividad antifúngica".

-1er lugar en el 11° concurso de creatividad e innovación en 2016 por parte de la Universidad de Guanajuato, proyecto de invención nivel Posgrado con el Proyecto "Fármaco BLDHIS-230775 contra cáncer de mama y próstata".

-Reconocimiento al mérito Universitario debido al mejor promedio en el programa de doctorado directo en 2015, 2016, 2017.

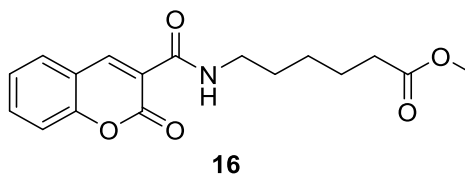
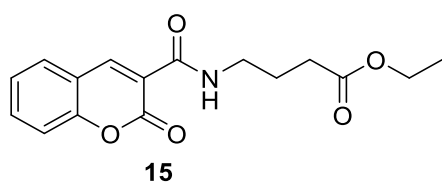
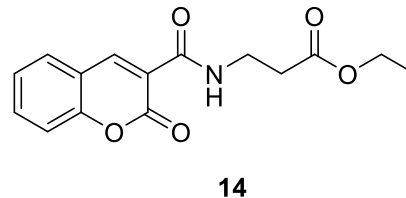
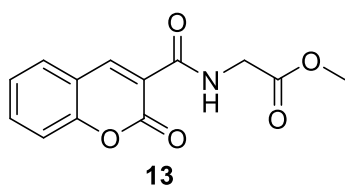
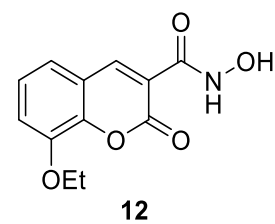
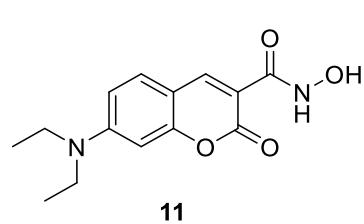
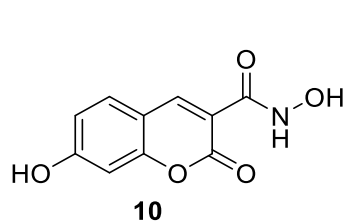
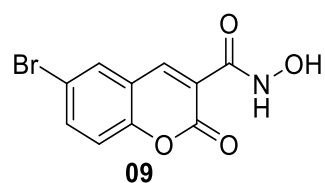
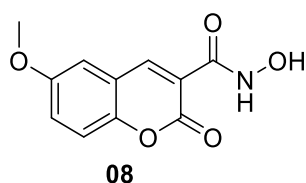
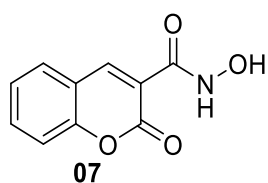
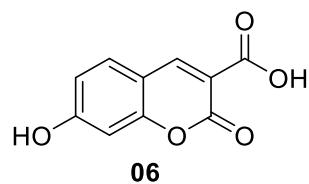
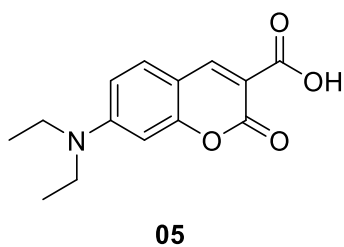
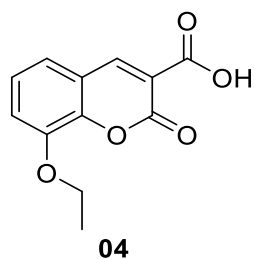
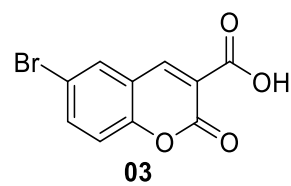
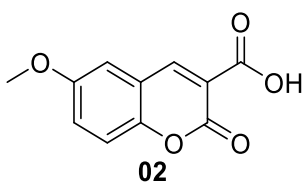
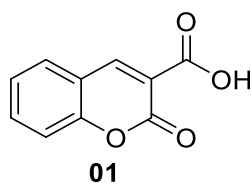
Índice

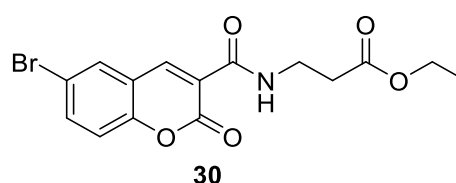
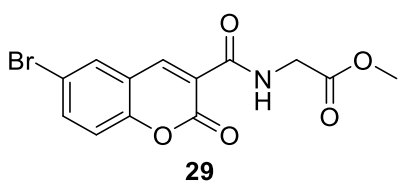
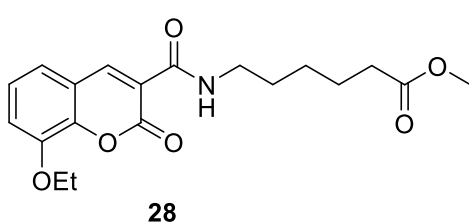
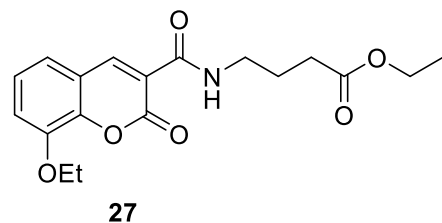
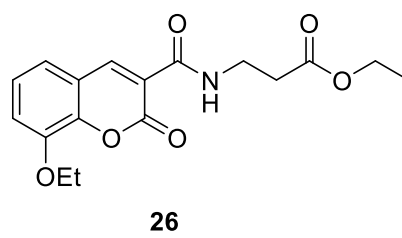
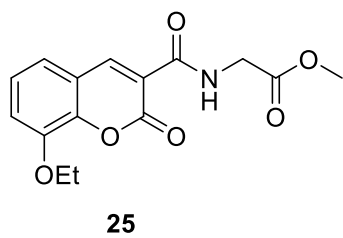
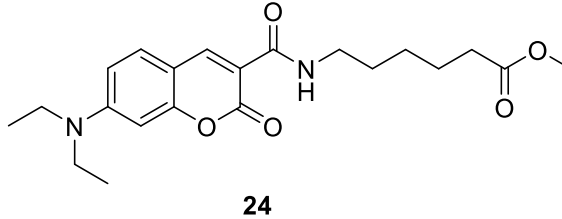
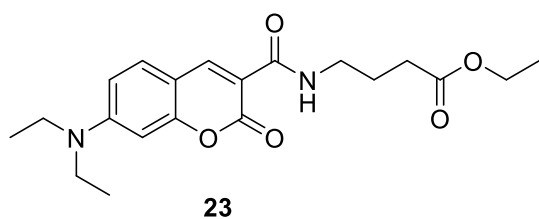
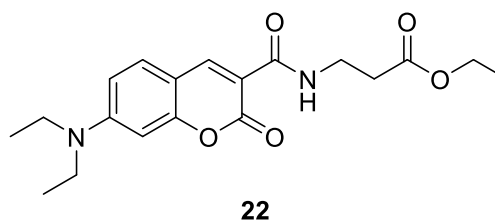
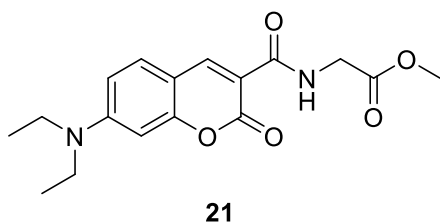
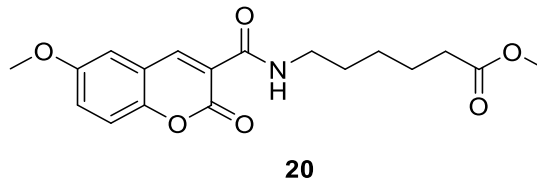
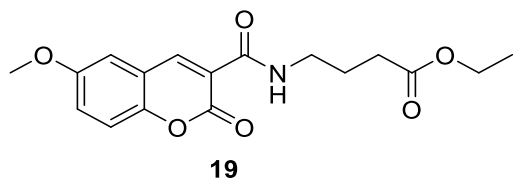
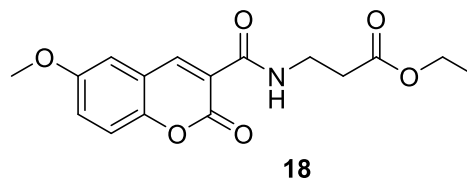
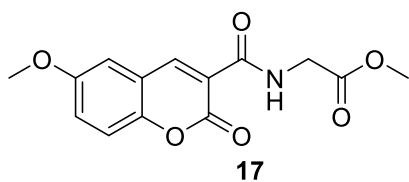
Contenido

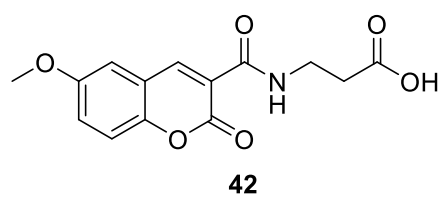
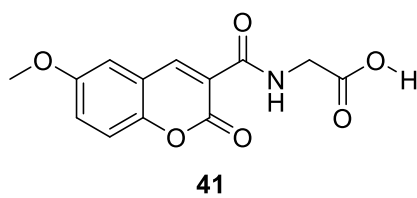
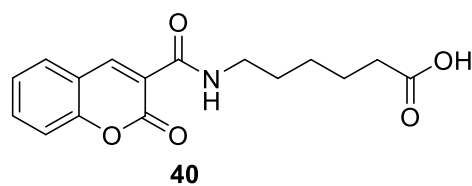
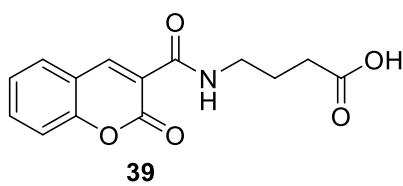
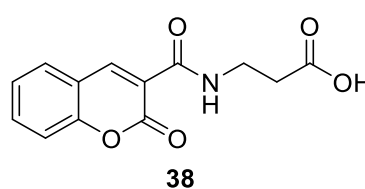
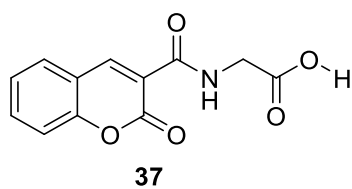
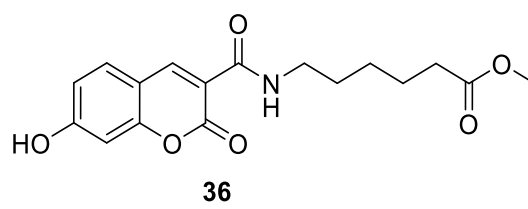
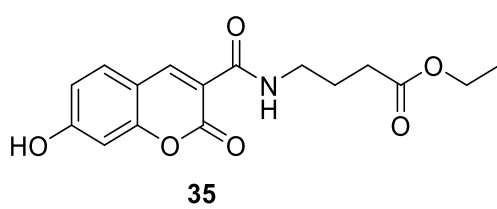
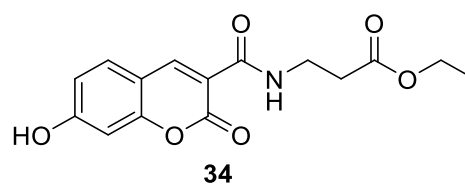
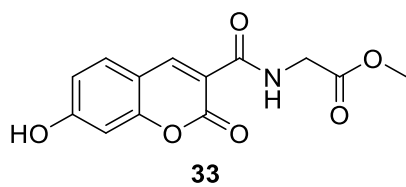
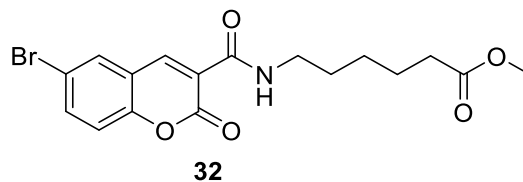
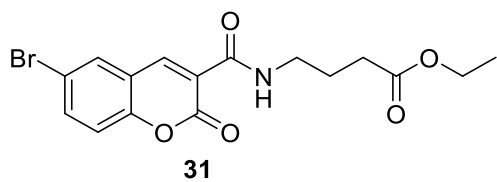
ÍNDICE DE MOLÉCULAS SÍNTETIZADAS	1
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS	14
RESUMEN	17
CAPITULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN	19
1.1.1 Cumarinas y cáncer	19
1.1.2 Ácidos hidroxámicos	20
1.1.3 Desacetilasas de histonas (HDACs)	23
1.1.4 Ácidos hidroxámicos fluorescentes	23
1.2 JUSTIFICACIÓN	26
1.3 HIPÓTESIS	26
1.4 OBJETIVO GENERAL	26
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
1.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
1.7 CONCLUSIONES	55
CAPITULO II	19
2.1 INTRODUCCIÓN	56
2.1.1 Cumarinas y Antifúngicos	56
2.1.2 Triazoles	57
2.1.3 Cándidas	61
2.1.4 CYP450	62
2.2 JUSTIFICACIÓN	63
2.3 HIPÓTESIS	64
2.4 OBJETIVO GENERAL	64
2.5 OBJETIVOS ESPECIFICOS	64
2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
2.7 CONCLUSIONES	90
CAPITULO III	56
3.1 INTRODUCCIÓN	93
3.1.1 Flavaglinas	93

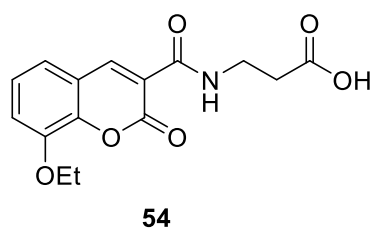
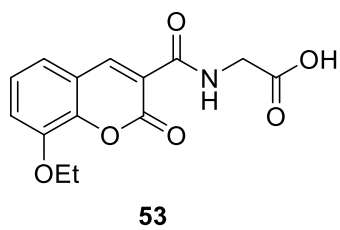
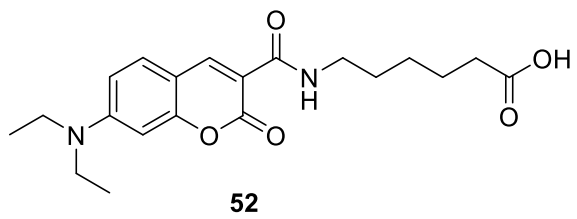
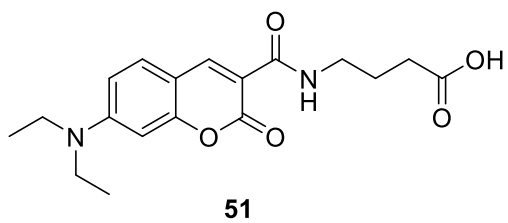
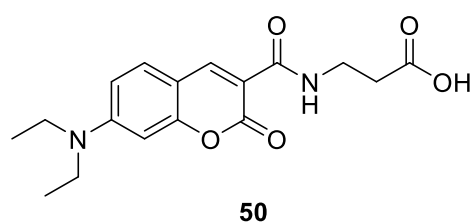
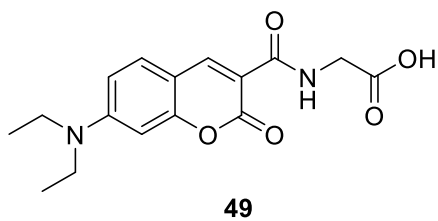
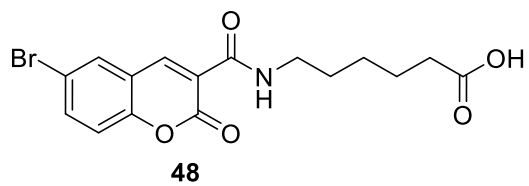
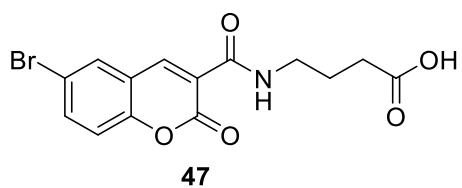
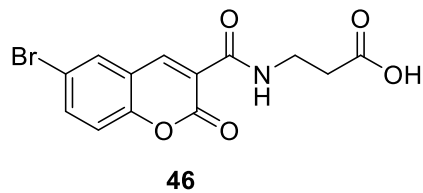
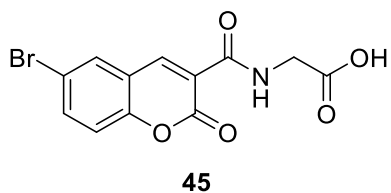
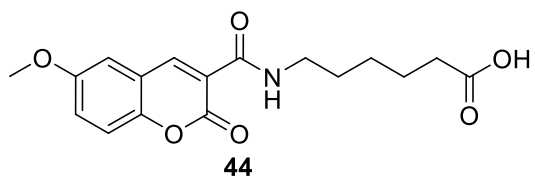
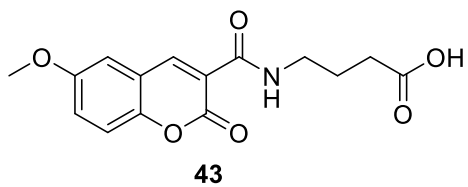
3.1.2 Materiales fluorescentes	94
3.2 JUSTIFICACIÓN.....	96
3.3 HIPÓTESIS.....	96
3.4 OBJETIVO GENERAL.....	97
3.5 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	97
3.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	98
3.6.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	98
3.6.2 ANÁLISIS UV	108
3.7 CONCLUSIONES	110

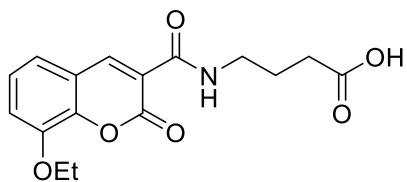
ÍNDICE DE MOLÉCULAS SÍNTETIZADAS



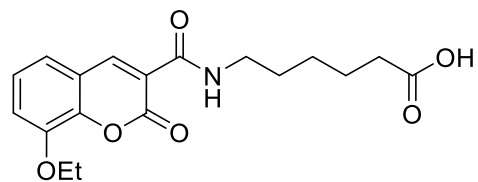




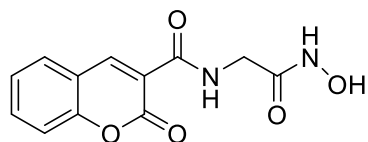




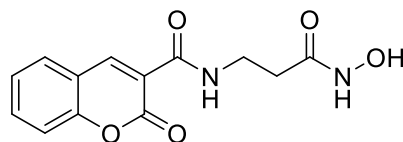
55



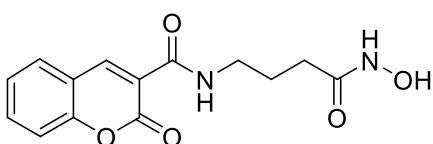
56



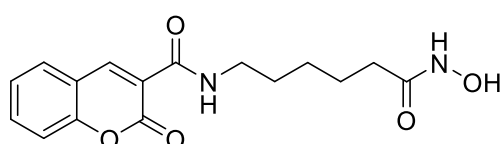
57



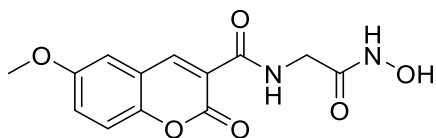
58



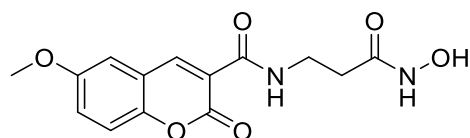
59



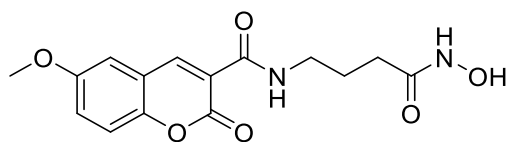
60



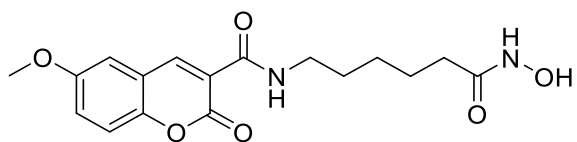
61



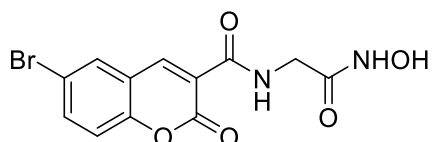
62



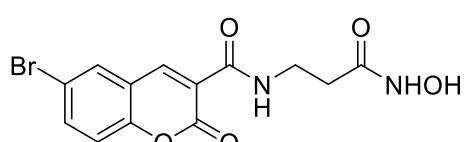
63



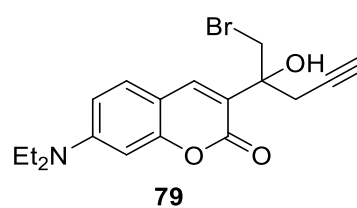
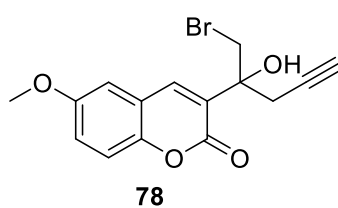
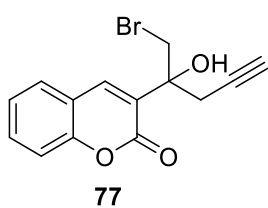
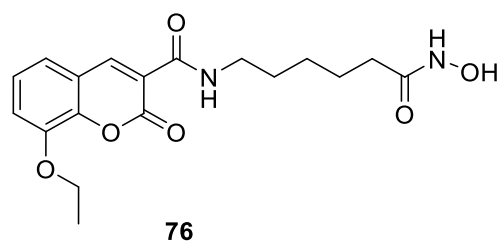
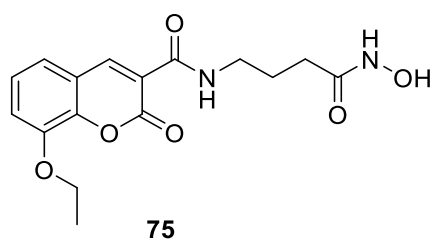
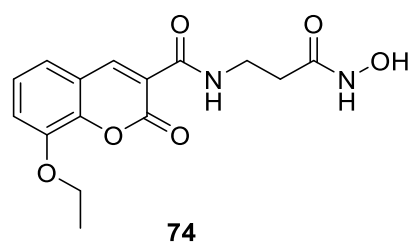
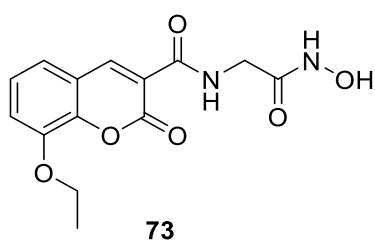
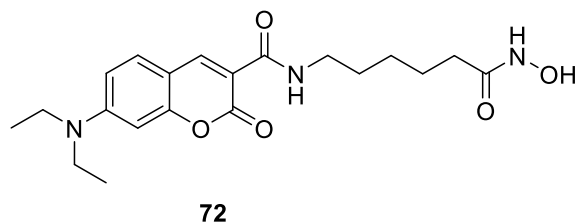
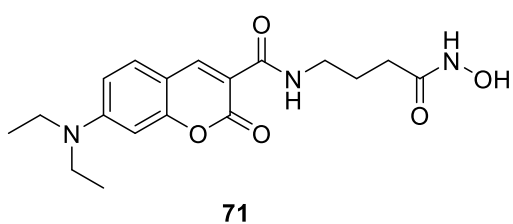
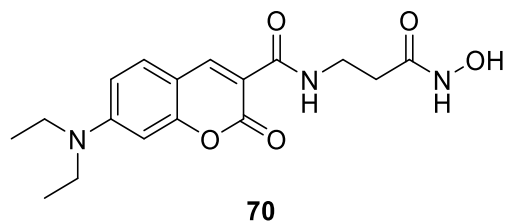
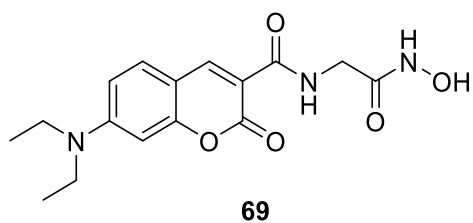
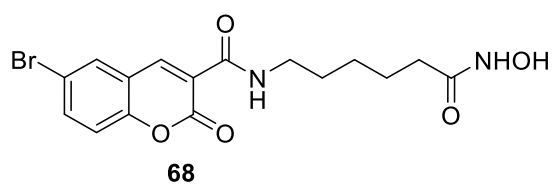
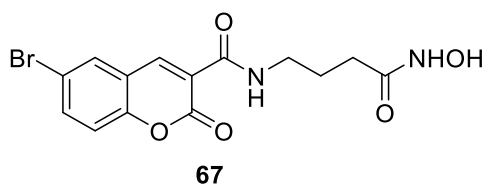
64

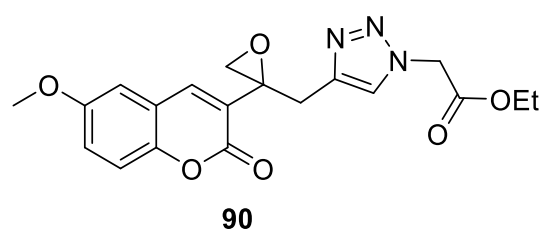
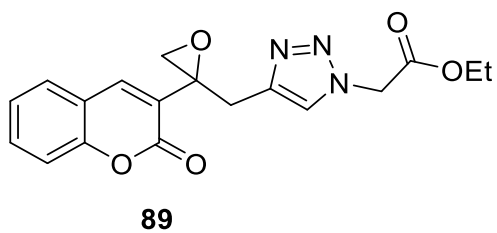
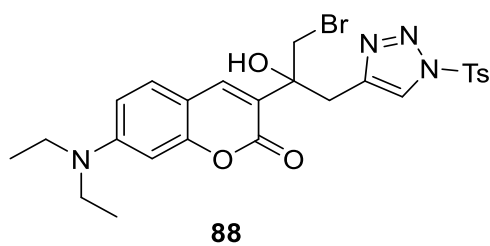
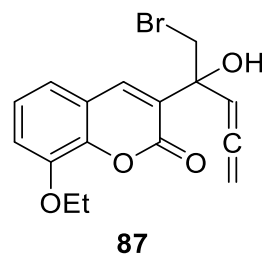
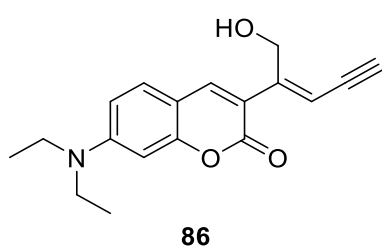
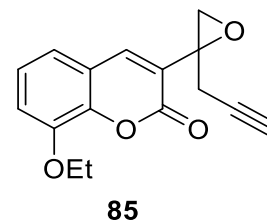
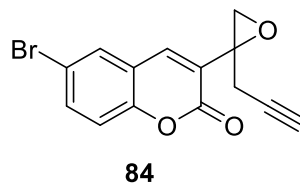
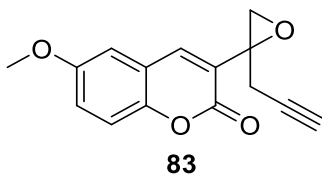
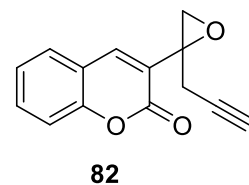
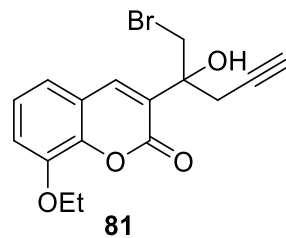
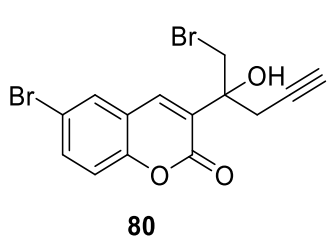


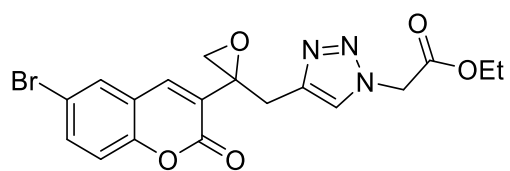
65



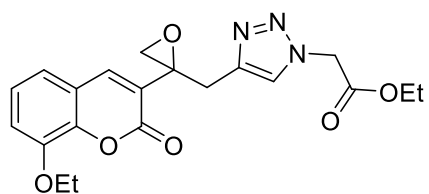
66



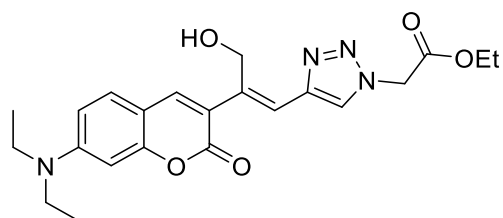




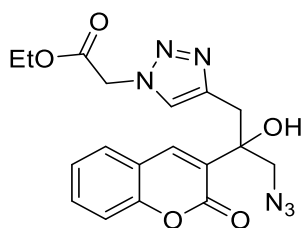
91



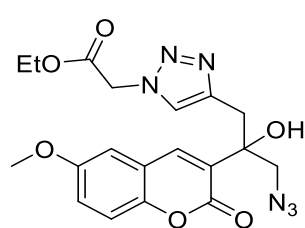
92



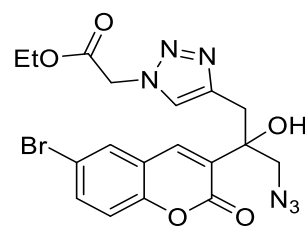
93



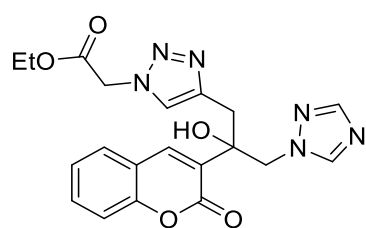
94



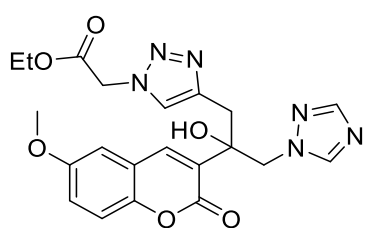
95



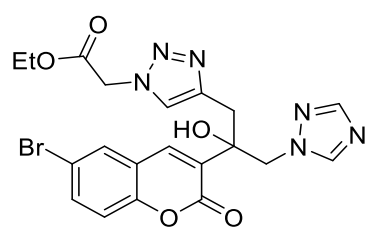
96



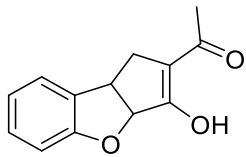
97



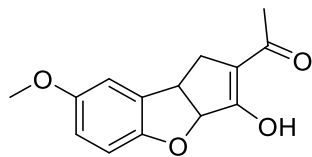
98



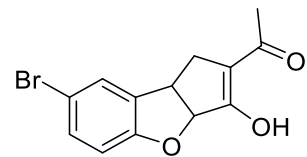
99



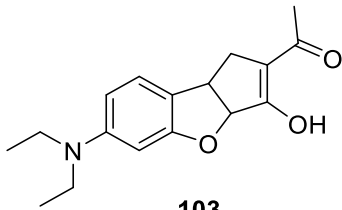
100



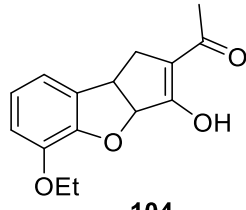
101



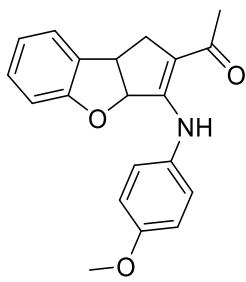
102



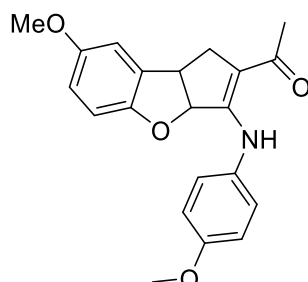
103



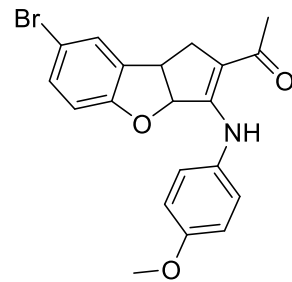
104



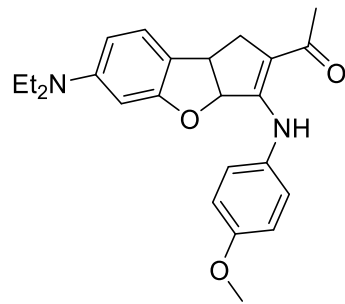
105



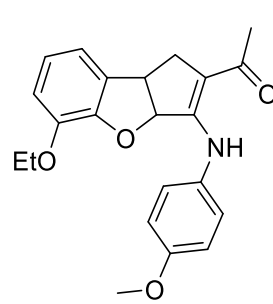
106



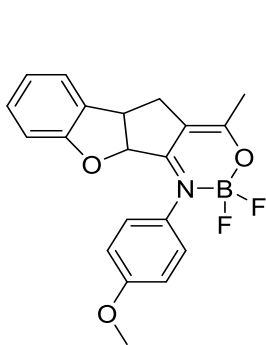
107



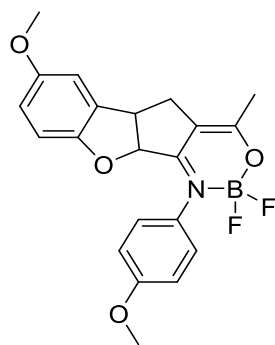
108



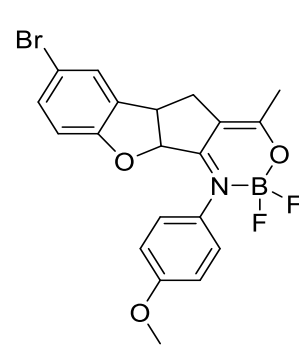
109



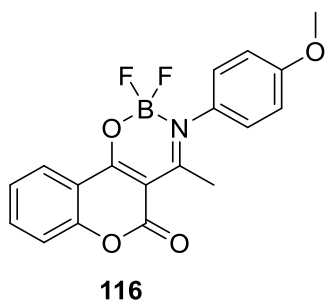
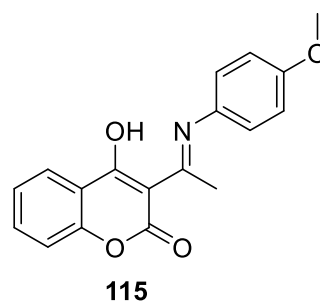
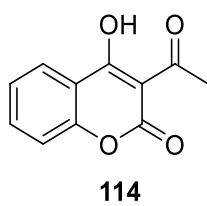
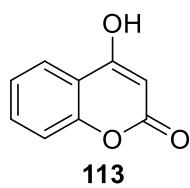
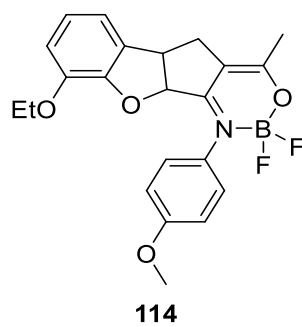
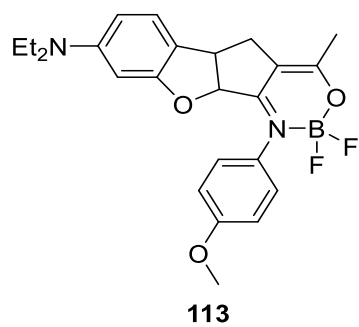
110



111



112



ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ABC	Área Bajo la Curva
BT474	Línea celular de cáncer de seno humana (Human breast tumor cell line)
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de seno humana (Human breast tumor cell line)
SAHA	Ácido Hidroxámico Suberoilánilida (Suberoylanilide Hydroxamic Acid)
Abs	Absorción en UV
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación
AcOEt	Acetato de Etilo
AC	Acetil Carboxilasa
HAT	Acetil transferasa (Histone Acetil Transferase)
Ac	Acetilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
CA	Anhidrasa carbónica
CDI	Carbonildiimidazol
CAP	Tapón (Capping)
CD1	Ciclina D1
CYP	Citocromo P450 (Cytochrome P450)
DAA	Dietilamino Azida
HMBC	Correlación Heteronuclear a múltiples enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	Correlación heteronuclear Cuántica Única (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
EIL	Energía de Interacción del Ligando
DMAP	Dimetilamino piridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
Em	Emisión
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
COSY	Espectroscopía de correlación (CORrelated SpectroscopY)
EtOH	Etanol
ESIPT	Transferencia de Próton en estado excitado (Excited State Intramolecular Proton Transfer)
Hz	Hertz
Hex	Hexano
HDAC	Deacetilasa de histonas (Histone Deacetilase)
IR	Infrarrojo
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
IC ₅₀	Media de la concentración inhibitoria máxima (Half Maximal Inhibitory Concentration)

MMP	Metaloproteinasas de Matriz Extracelular (Matrix metalloproteinase)
MeOH	Metanol
MW	Microondas (Microwave)
MTCYP51	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Citocromo P51
NBS	N-bromosuccinimida
NAD	Nicotinamida Adenin Dinucleotido
NCAC	Non-Candida Albicans
No.	Número
TBTU	o-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronium tetrafluoroborato
ppm	Partes por millón
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PC3	Línea Celular de Cáncer de Próstata (Prostate cancer cell line)
PDB	Banco de Datos de Proteínas (Protein data bank)
HSP90	Proteína shock térmico (Heat Shock Protein 90)
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (Cyclin Dependent Kinase)
SAR	Relación estructura actividad (Structure-Activity Relationship)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Raíz cuadrada de la desviación media (Root Mean Square Deviation)
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
HBSS	Solución balanceada de Hank (Hank's Balanced Salt Solution)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (Meticilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
SRB	Sulforodamina B
S _N 2	Sustitución Nucleofílica Bimolecular
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
Ts	Tosilo
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
PI	Yoduro de propidio (Propidium Iodide)
TMSOI	Yoduro de trimetilsulfoxonio (Trimethylsulfoxonium iodide)
ZBG	Grupo quelante de Zinc (Zinc Bonding Group)

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Moléculas propuestas para realizar *docking* molecular.
- Tabla 2.** Energías de interacción de las 16 moléculas y SAHA con HDAC8.
- Tabla 3.** Rendimientos de la síntesis de materias primas.
- Tabla 4.** Condiciones de reacción para la síntesis de ácidos hidroxámicos.
- Tabla 5.** Rendimientos de la reacción para la obtención de los ácidos hidroxámicos.
- Tabla 6.** Rendimientos de la reacción de acoplamiento para la formación de amidas.
- Tabla 7.** Desplazamientos en RMN-¹H en ppm para las amidas sintetizadas.
- Tabla 8.** Desplazamientos en RMN-¹³C en ppm para las amidas sintetizadas.
- Tabla 9.** Rendimientos y tiempos de reacción para la hidrólisis de los derivados de amida.
- Tabla 10.** Desplazamientos en RMN-¹³C en ppm los nuevos ácidos carboxílicos.
- Tabla 11.** Desplazamientos en RMN-¹³C en ppm para los carbonilos de los ácidos hidroxámicos.
- Tabla 12.** Efectos en la inhibición de crecimiento (GI%) causados por los compuestos sintetizados en células cancerosas.
- Tabla 13.** Efecto de los compuestos en la expresión de genes relacionados con la apoptosis e interrupción del ciclo celular.
- Tabla 14.** Longitudes de absorción y emisión correspondientes a los compuestos **a-k**.
- Tabla 15.** Susceptibilidad de especies NCAC.
- Tabla 16.** Parámetros de red usados en el *docking* ciego.
- Tabla 17.** Parámetros de búsqueda empleados por el algoritmo.
- Tabla 18.** Parámetros utilizados para delimitar la búsqueda a la cavidad del sitio activo.
- Tabla 19.** Resultados del acoplamiento *docking* para las moléculas de cumarina-bitriazol y cumarina-azida.
- Tabla 20.** Rendimientos de la reacción de Barbier y formación del oxirano.
- Tabla 21.** Desplazamientos y constantes de acoplamiento para los compuestos obtenidos.
- Tabla 22.** Comparación de los rendimientos de la reacción 1,3-dipolar.
- Tabla 23.** Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de las estructuras obtenidas.
- Tabla 24.** Rendimientos de reacción usando la azida orgánica.
- Tabla 25.** Rendimientos de la reacción de apertura de anillo usando Azida como nucleófilo.
- Tabla 26.** Desplazamientos químicos de protón de las señales de triazol y metileno.
- Tabla 27.** Condiciones de reacción para la apertura del Oxirano usando 1H-1,2,4-triazol.
- Tabla 28.** Desplazamiento químico y constante de acoplamiento del metileno base de 1,2,4-triazol.
- Tabla 29.** Desplazamiento en cm⁻¹ de las bandas de los principales grupos funcionales.
- Tabla 30.** Rendimientos de reacción para las moléculas obtenidas.
- Tabla 31.** Condiciones de reacción para la síntesis de enaminas.
- Tabla 32.** Condiciones y rendimientos de los compuestos coordinados.

ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

Figura 1. Relación estructura actividad de diferentes derivados de cumarina con actividad anticancerígena.

Figura 2. Estructura del grupo funcional ácido hidroxámico.

Figura 3. Estructura de a) Cipemastato y b) Marimastato.

Figura 4. a) Estructura del profármaco de cumarina usado como HDAC; b) Modo de interacción del profármaco con la isoenzima hCAII.

Figura 5. Estructura del ácido suberoilánilido hidroxámico.

Figura 6. Modelo básico para el diseño de inhibidores de HDACs

Figura 7. Derivados de cumarina con actividad inhibidora de HDACs y además con propiedades fluorescentes.

Figura 8. Mejores poses para 8 de 16 diferentes moléculas propuestas junto con SAHA.

Figura 9. Enlaces de hidrógeno, presentes al acoplarlos en el sitio activo de HDAC8.

Figura 10. Espectro de RMN-¹H de la molécula **4** en CDCl₃ 500MHz.

Figura 11. Espectro de IR de la molécula **7** en KBr.

Figura 12. Espectro de masas para la molécula **7** ESI (+).

Figura 13. Espectro de RMN-¹H en CDCl₃ de una molécula **13**, 500 MHz.

Figura 14. Espectro de RMN-¹³C en CDCl₃ de la molécula **13**, 125 MHz.

Figura 15. Espectro de RMN-¹H en DMSO-d₆ de la molécula **53**, 500 MHz

Figura 16. Espectro de RMN-¹³C en DMSO-d₆ para una molécula **37** 500 MHz.

Figura 17. Comparación de espectros de RMN-¹³C de las moléculas **39** (Azul) y **59** (rojo) en DMSO-d₆ 125 MHz.

Figura 18. Gráfica de espectros de máxima Absorción y Emisión para la molécula **70**, en MeOH 10⁻⁶ M.

Figura 19. Intensidad relativa de la emisión de fluorescencia, y localización subcelular de los compuestos **70** y **72**.

Figura 20. Interacciones calculadas por el proceso *docking* para SAHA y los ligantes **60**, **64**, **76**, **68** y **70** en el sitio activo de HDAC1.

Figura 21. Potencial interacción de apilamiento- π entre los ligandos y el residuo de fenilalanina en el sitio activo de HDAC6.

Figure 22. Interacciones de puente de hidrógeno para SAHA y los ligantes en el sitio activo de HDAC8.

Figura 23. Derivados de cumarina con propiedad antifúngica frente a distintos hongos.

Figura 24. Isómeros estructurales de triazol.

Figura 25. Algunos de los análogos de fluconazol reportados.

Figura 26. Presencia de 1,2,3-triazoles en distintas moléculas bioactivas.

Figura 27. Máxima aproximación al sitio activo calculada para las moléculas propuestas.

Figura 28. Microscopía de: a) *C. glabrata*, b) *C. parapsilosis*, c) *C. tropicalis*; Colonias macroscópicas de a) *C. glabrata*, b) *C. parapsilosis*, c) *C. tropicalis*.

- Figura 29.** Acción de los antifúngicos en la biosíntesis de ergosterol.
- Figura 30.** Estructura de Rayos X de 2VKU con 4,4'-dihidroxi-benzofenona.
- Figura 31.** Estructura general de las moléculas evaluadas en el *docking*.
- Figura 32.** Espectro RMN-¹H del alcohol propargílico de la molécula **80** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 33.** Espectro RMN-¹H del oxirano de la entrada **84** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 34.** Difracción de rayos X para el oxirano **82**.
- Figura 35.** Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de **86**.
- Figura 36.** Espectro RMN-¹H del aleno **87** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 37.** Espectro RMN-¹³C del aleno **87** en CDCl₃, 125 MHz.
- Figura 38.** Espectro IR del aleno **87** en KBr.
- Figura 39.** Espectro RMN-¹H de **89** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 40.** Espectro RMN-¹H de **93** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 41.** Difracción de rayos X de **93**.
- Figura 42.** Espectro de RMN-¹H del compuesto **b** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 43.** Difracción de Rayos X para la molécula **88**.
- Figura 44.** Espectro de RMN-¹H de la molécula **95** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 45.** Esp Espectro RMN-¹H de la molécula **97** en DMSO-d₆, 500 MHz.
- Figura 46.** Espectros IR de la familia de cumarinas con sustituyente Bromo.
- Figura 47.** Traslapo de espectros UV de la familia de cumarinas con sustituyente Metoxilo en MeOH 10⁻⁶ M.
- Figura 48.** Gráficas de inhibición de crecimiento celular para las moléculas que tuvieron mejor actividad biológica.
- Figura 49.** Estructura de la rocaglamida.
- Figura 50.** Ejemplos de análogos de flavaglinas sintetizados.
- Figura 51.** Fluoróforos comunes con átomos de oxígeno.
- Figura 52.** Moléculas de organoboro con propiedades fluorescentes.
- Figura 53.** Mecanismo de reacción para la formación de ciclopenta[*b*]benzofuranos.
- Figura 54.** Espectro RMN-¹H del compuesto **100** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 55.** Comparación de espectros RMN-¹H del compuesto deseado y los subproductos.
- Figura 56.** Espectro RMN-¹H de 3-acetil-4-hidroxycumarina en CDCl₃.
- Figura 57.** Espectro RMN-¹H de la base de Schiff en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 58.** Espectro RMN-¹H del compuesto coordinado en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 59.** Difracción de rayos X de la cumarina coordinada.
- Figura 60.** Espectro RMN-¹H de la enamina **105** en CDCl₃, 500 MHz.
- Figura 61.** Difracción de rayos X de una rocaglamida coordinada.
- Figura 62.** Espectros normalizados UV, de la familia de compuestos sin sustituyente en el anillo aromático.
- Figura 63.** Emisión de luz de la molécula **113** en estado sólido.
- Esquema 1.** Ruta de síntesis para la formación de ácidos hidroxámicos unidos a cumarina.
- Esquema 2.** Síntesis de ácidos hidroxámicos a partir de ácidos carboxílicos.

Esquema 3. Ruta de síntesis planteada para la síntesis de los análogos de fluconazol.

Esquema 4. Esquema general de la reacción de cumarinas a ciclopenta[*b*]benzofuranos.

Esquema 5. Ruta de síntesis planteada para la obtención de plataformas de cumarina.

Esquema 6. Ruta de síntesis propuesta para compuestos coordinados.

RESUMEN

En este proyecto se planteó el diseño, síntesis y aplicación biológica de una serie de moléculas que tengan como núcleo base el heterociclo de cumarina, el cual fue estratégicamente funcionalizado en diferentes posiciones y por diferentes grupos funcionales, con el objetivo de ser usadas como marcadores biológicos y sondas fluorescentes.

Con esta propuesta, el diseño de las moléculas tuvo el respaldo de estudios *in silico* con el enfoque de ser aplicados como: Antiproliferativos en el Capítulo I, Antifúngicos en el Capítulo II; y por último, moléculas con posible actividad fluorescente en el Capítulo III.

Los resultados son discutidos en cada capítulo, a manera de síntesis podemos señalar que las moléculas **1** a **76** se obtuvieron con un rendimiento global de 30-87%, dicha síntesis involucró 4 etapas de reacción, por otro lado su actividad antiproliferativa fue evaluada en células cancerosas de mama (BT-474, MDA-MB-231) y próstata (PC3), observando que el compuesto **76** en concentración similar (10 mM) al fármaco de referencia (SAHA), mostró un efecto semejante en las líneas celulares. Además, la molécula **72** presentó actividad fluorescente en las células MDA-MB-231 pudiendo ser localizada en citoplasma y núcleo, estos datos tienen correlación con los estudios *docking*, donde la energía para **76** y **72** es similar o igual a SAHA.

Referente al Capítulo II, se obtuvieron las moléculas **77** a **97** con alta similitud estructural al antifúngico fluconazol pero, de manera inesperada contrario a este fármaco de referencia no presentaron actividad antifúngica relevante frente a las cepas de *Candida* evaluadas (*Albicans*, *Glabrata*, *Parapsilosis*, *Krusei*) al utilizar una evaluación por diluciones seriadas. La síntesis de las moléculas involucró una ruta de 3 pasos con rendimientos globales de 50-70%, de manera general los compuestos presentan solubilidad relativa, en este caso, ninguno correlaciona con los resultados reportados en el estudio *docking*.

Por último, se sintetizaron 6 estructuras derivadas del núcleo de cumarina **110-116**, con el propósito de usarlas como potenciales compuestos fluorescentes; el propósito fue obtener una molécula análoga de Rocaglamida con propiedades fluorescentes, para ello se realizó una coordinación con el ácido de Lewis (BF₃OEt₂), el resultado fue que las moléculas finales muestran fluorescencia en estado sólido con un rendimiento global de 20-30%, convirtiéndose en estructuras interesantes al presentar esta propiedad.

CAPITULO I

AGENTES ANTI-PROLIFERATIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Cumarinas y cáncer

En la actualidad el cáncer se ha convertido en la segunda causa de muerte alrededor del mundo¹, por tal motivo se ha realizado un enorme trabajo de investigación en diferentes áreas de la ciencia para encontrar una solución a este problema de salud. Al respecto, el área de la síntesis orgánica contribuye con el diseño y síntesis de múltiples compuestos, con el objetivo de encontrar moléculas “hit” que posean mayor selectividad hacia una diana terapéutica, más potentes y con mínimos efectos secundarios^{2,3}. En este sentido, los derivados de cumarinas, estructuras presentes en varias plantas, hongos y bacterias; han sido posicionados como moléculas de interés debido a sus bajos efectos terapéuticos secundarios^{4,5}. Dentro de las múltiples actividades que se le atribuyen al heterociclo de cumarina están: antibacteriales⁶, antimutagénicos⁷, inhibidores de la ciclooxigenasa⁸, antiinflamatorias⁹, captosres de especies reactivas de oxígeno¹, anticoagulantes¹⁰, vasodilatadores¹¹ y anticancerígenos¹².

Sobre la actividad anticancerígena, evaluaciones biológicas han mostrado que existen diferentes mecanismos por los cuales pueden actuar para cumplir este propósito, algunos de los blancos terapéuticos son las quinasas, aunque también se sabe que pueden actuar como interruptores del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis, de la proteína HSP90, de la telomerasa, de la anhidrasa carbónica y de la aromatasas y sulfatasas^{11,13}. Gracias a estos estudios, actualmente se cuenta con registros de relación estructura-actividad (SAR) y concluyen que, dependiendo de la diversidad en la sustitución del núcleo de cumarina, permite potencializar o ampliar el espectro de actividad biológica deseado.

En la Figura 1, se muestra una representación de la relación estructura-actividad de diferentes cumarinas sustituidas con la respectiva vía en la que actúan.

¹ Siegel, R. L.; Miller, K.D.; Jemal, A. *CA CANCER J CLIN.* **2016**, *66* (1), 7-30.

² Bronikowska, J.; Szlízka, E.; Jaworska, D.; Czuba, Z.P.; Krol, W. *Molecules.* **2012**, *17* (6), 6449-6464.

³ Musa, M. A.; Cooperwood, J.S.; Khan, M.O. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15* (26), 2664-2679.

⁴ Wu, L.; Wang, X.; Xu, W.; Farzaneh, F.; Xu, R. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (32), 4236-4260.

⁵ O'Kennedy, R.; Thornes, R. D. *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*, Wiley, **1997**, ISBN: 978-0-471-96997-6.

⁶ Wang, S.-F.; Ying, Y.; Wu, X.; Qiao, F.; Sha, S.; Lv, P.C.; Zhiao, J.; Zhu, H.L. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (21), 5727-5737.

⁷ Bhattacharya, S. *Research J. Med. Plant.* **2011**, *5*(2), 116-126.

⁸ Cesar, J. M.; García-Avello, A.; Navarro, J. L.; Herraéz, M.V. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* **2004**, *15* (8), 673-676.

⁹ Fylaktakidou, K. C.; Hadjipavlou-Litina, D.J.; Litinas, K.E.; Nicolaidis, D.N. *Curr. Pharma. Design.* **2004**, *10* (30), 3813-3833.

¹⁰ Gomez-Outes, A.; Suárez-Gea, M.L.; Calvo-Rojas, G.; Lecumberri, R.; Rocha, E.; Pozo-Hernández, C.; Terleira-Fernández, A.I.; Vargas-Castrillón, E. *Curr. Drug Discov. Tech.* **2012**, *9* (2), 83-104.

¹¹ Bertin, R.; Chen, Z.; Martínez-Vázquez, M.; García-Argaéz, A.; Froidi G.; *Phytomedicine*, **2014**, *21* (5), 586-594.

¹² Thakur, A.; Singla, R.; Jaitak, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 476-495.

¹³ Peng, X.-M.; Damu, G.L.; Zhou, C. *Curr. Pharm. Design.* **2013**, *19* (21), 3884-3930.

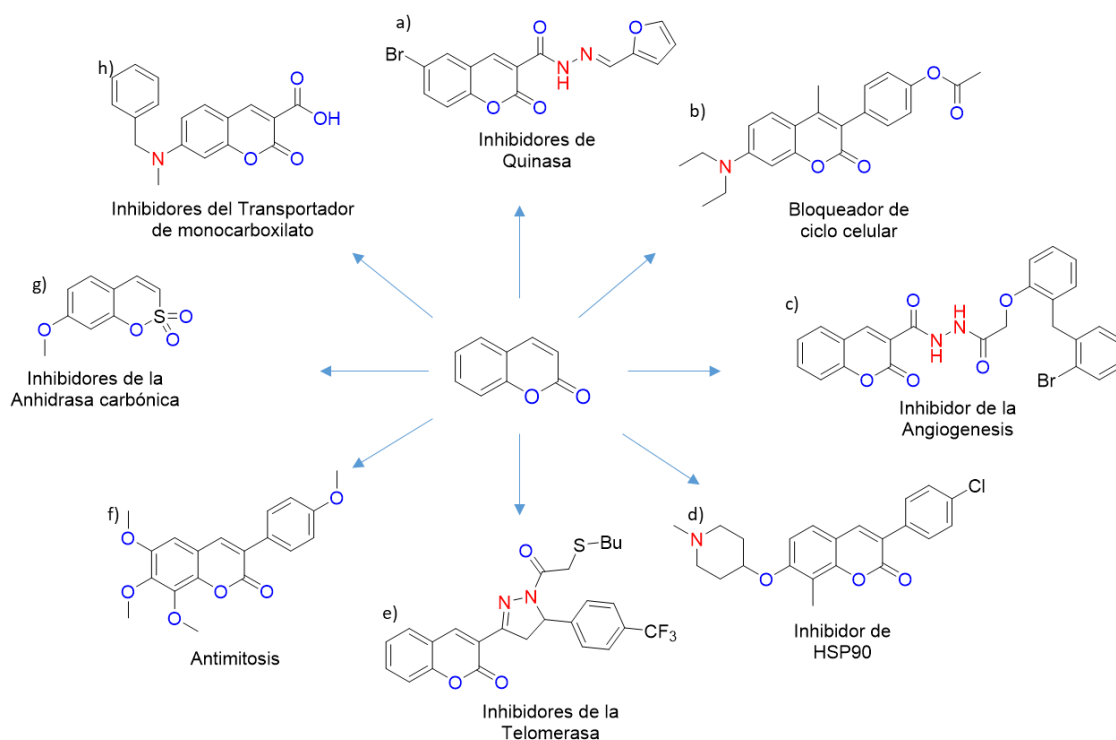


Figura 1. Relación estructura-actividad de diferentes derivados de cumarina con actividad anticancerígena¹⁴.

1.1.2 Ácidos hidroxámicos

Los ácidos hidroxámicos son una clase de compuestos con una estructura general presentada en la Figura 2. Son usados en su mayoría como agentes quelantes de metales¹⁵ entre los que destacan el hierro, el cual es un componente clave de los citocromos y proteínas hierro-azufre (involucradas en el transporte de electrones), dichas propiedades son usadas por algunas bacterias para obtener Fe (III).¹⁶



Figura 2. Estructura del grupo funcional ácido hidroxámico.

¹⁴ a) Nasr, T.; Bondock, S.; Youns, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 539-544.; b) Musa, M.A.; Badisa V.L.; Latinwo, L.M.; Cooperwood, J.; Sinclair, A.; Abdullah, A. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 2017-2022.; c) Avin, B.R.V.; Thirusangu, P.; Lakshmi Ranganatha, V.; Firdouse, A.; Prabhakar, B.T.; Khanum, S.A. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 211-218.; d) Zhao, H.; Yan, B.; Peterson, L.B.; Blagg, B.S.J. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 327-333.; e) Wu, X.Q.; Huang, C.; Jia, Y.M.; Song, B.A.; Li, J.; Liu, X.H.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *32*, 6565-6575.; f) Tsyganov, D.V.; Chernysheva, N.B.; Salamandra L.K.; Konyushkina L.D.; Atamanenko, O.P.; Semenova, M.N.; ; Semenov, V. *Mendeleev Commun.* **2013**, *23*, 147-158.; g) Tanc, M.; Carta, F.; Bozdog, M.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4502-4510.; h) Draoui, N.; Schicke, O.; Fernandes, A.; Drozak, X.; Nahra, F.; Dumont, A.; Douxfils, J.; Hermans, E.; Dogné, J.M.; Corbau, R.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Sonveaux, P.; Feron, O.; Riant, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7107-7117.

¹⁵ J. Miller, M. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1563-1579.

¹⁶ Baroncelli, F. J.; Grossi, G. *Inorg. Nuclear Chem.* **1965**, *27*, 1085-1092.

Estas moléculas están catalogadas como una clase importante de agentes con un amplio intervalo de actividades biológicas. Ehrlich y Langley a principios del siglo XX, idearon una correlación entre la actividad biológica y la capacidad de dichos compuestos para unirse a los componentes celulares dando como resultado que al menos 66 enzimas humanas sean blancos terapéuticos aprobados para nuevos fármacos¹⁷. El diseño de moléculas capaces de unirse a iones metálicos en el centro de estas enzimas representa un área activa en el descubrimiento de fármacos. Los ácidos hidroxámicos constituyen una clase de inhibidores de enzimas de moléculas pequeñas que recientemente han recibido considerable atención.

A pesar de ser descubiertos por Lossen en 1869¹⁸ la química y la actividad biológica de los ácidos hidroxámicos se mantuvieron elusivas hasta principios de 1980 donde la información respecto a su bioactividad, síntesis y de la diversidad estructural de sus complejos metálicos fue explotada. La bioactividad innata de los ácidos hidroxámicos ha sido sin duda el ímpetu para encontrar métodos eficientes de síntesis y la respectiva construcción de derivados estructurales.¹⁹ Entre la basta variedad de aplicaciones industriales que tienen los ácidos hidroxámicos, resaltan:

- Inhibidores de metaloproteasas (MMP's): Una gran familia de enzimas proteolíticas que contienen zinc, pueden inactivar citosinas y liberar factores de crecimiento²⁰. Los primeros fármacos utilizados presentaban una baja selectividad²¹ y por consiguiente fueron una decepción (Figura 3 a y b).

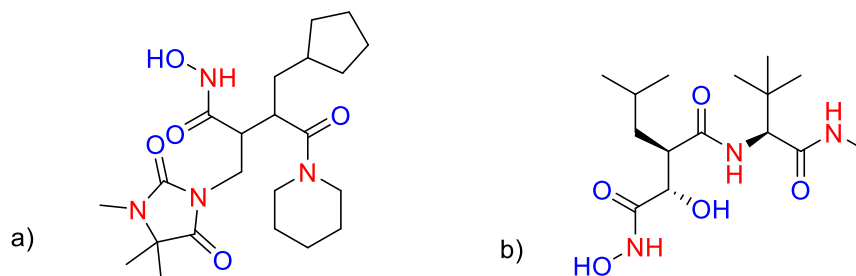


Figura 3. Estructura de a) Cipemastato y b) Marimastato.

- Inhibidores de anhidrasa carbónica (CA): Una enzima que cataliza la conversión rápida de dióxido de carbono y agua a bicarbonato y protones²², su centro activo contiene un ion de zinc. Uno de los problemas en el diseño de inhibidores de CA, es la falta de selectividad que se tiene respecto a la isoforma de la CA del patógeno respecto a la isoforma humana.²³ A la fecha, solamente los profármacos con base de cumarina han logrado esta selectividad, bloqueando el canal de entrada de la cavidad del sitio activo^{24,25} (Figura 4).

¹⁷ Lossen, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1869**, *150*, 314-322.

¹⁸ Griffith, D.; Devocelle, M.; Marmion, C. J. *Wiley-VCH*, **2009**, *2*, 93-144.

¹⁹ Codd, R. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 1387-1408.

²⁰ Verma, R. P.; Hansch, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2223-2268.

²¹ Fisher, J. F.; Mobashery, S. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 115-136.

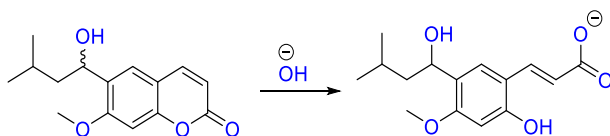
²² Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 146-189.

²³ Carta, F.; Innocenti, A.; Hall R.A.; Mühlischlegel, F.A.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2521-2526.

²⁴ Maresca, A.; Temperini, C.; Vu, H.; Pham, N. B.; Poulsen, S.-A.; Scozzafava, A.; Quinn, R. J.; Supuran, C.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3057-3062.

²⁵ Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2241-2246.

a)



b)

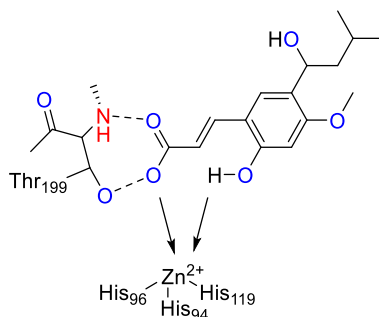


Figura 4. a) Estructura del profármaco de cumarina usado como inhibidor de HDAC y b) Modo de interacción del profármaco con la isoenzima hCAII.

- Inhibidores de las desacetilasas de histonas (HDAC): La inhibición de HDAC induce la hiperacetilación de las histonas del nucleosoma y otras proteínas, lo que resulta en la expresión de genes y la regulación de factores de transcripción que producen la detención del crecimiento celular, inhibición de la angiogénesis en células neoplásicas reprimidas y por consiguiente la muerte celular.²⁶

Los ácidos hidroxámicos, se han posicionado entre los principales inhibidores de HDAC, por su potente efecto quelante al metal Zn de las enzimas. Existen medicamentos comerciales con el fragmento hidroxamato, como por ejemplo el SAHA (Figura 5), la principal desventaja es la poca selectividad hacia todas las HDAC, surgiendo la necesidad de encontrar moléculas selectivas para las diferentes isoformas, considerando una ruta de síntesis simple que además de presentar actividad de inhibición enzimática puedan ser localizadas a nivel celular y poder diferenciar características fisiológicas y terapéuticas (K_d , K_{off}) específicas.²⁷

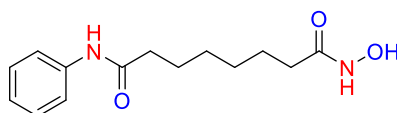


Figura 5. Estructura del ácido suberoilánilido hidroxámico.

²⁶ Xu, W. S.; Parmigiani, R.B.; Marks, P.A. *Oncogene* **2007**, *26*, 5541-5552.

²⁷ Marks, P.A.; Breslow, R. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 84-90.

1.1.3 Desacetilasas de histonas (HDACs)

En las células eucariotas, las proteínas de histonas son bloques de construcción vitales para el empaquetamiento del ADN en unidades de repetición nucleosomal que se pliegan a fibras de cromatina. Ha sido bien documentado que una elaborada colección de modificaciones posteriores a la traducción que incluyen acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y ADP-silación tienen lugar en los dominios de la "cola" de las histonas²⁸. De todas, la acetilación de los residuos de lisina en el extremo N-terminal de las histonas del núcleo juega un papel fundamental en la regulación de la expresión genética mediante el control de la accesibilidad de ADN en la cromatina, a la ARN polimerasa y co-factores. El estado de acetilación es regulado por las actividades opuestas de dos familias de enzimas, histona acetiltransferasas (HAT) y las HDAC²⁹.

Las HDACs son un grupo de enzimas dependientes de Zn presentes en varios organismos tales como bacterias, hongos, plantas y animales. En este último grupo desempeñan papeles cruciales en la modulación de la estructura de la cromatina celular, la transcripción, y la expresión génica. Pertenecen a la gran clase de la llamada "lisina-desacetilasa", una clase de enzimas que trabajan la eliminación de grupos acetilo de residuos de lisina en muchos sustratos diferentes, no sólo histonas³⁰. Desde el punto de vista de la química medicinal, la mayoría de los inhibidores de HDAC cae en un modelo farmacofórico ampliamente aceptado, el cual consiste en un grupo de terminación (*capping*, CAP), capaz de interactuar con el borde del túnel que conecta al sitio catalítico de la enzima con el exterior, al otro extremo posee un grupo enlazante hacia el zinc (ZBG), capaz de formar un complejo en la parte inferior del sitio catalítico, y un enlazador hidrofóbico (*linker*) que conecta las dos partes (Figura 6)³¹.

1.1.4 Ácidos hidroxámicos fluorescentes

Debido a la aplicabilidad general en enfermedades humanas, muchas industrias farmacéuticas/biotecnológicas están trabajando en el diseño de inhibidores contra HDACs³². Según la homología de secuencia, la filogenia y el requisito de cofactor, las HDAC humanas se han clasificado en clase I (HDAC1, -2, -3 y -8), clase II (HDAC4, -5, -7, -9 y -10), subfamilias de clase III (Sirt1, -2, -3, -4, -5, -6 y -7) y de clase IV (HDAC11). Mientras que las HDAC de clase I, II y IV son metaloproteínas con Zinc como cofactor, la HDAC de clase III requiere NAD⁺ como cofactor y estas enzimas se conocen como sirtuinas³³. Las localizaciones celulares y sus funciones fisiológicas generales/específicas han comenzado a emerger en los últimos años³⁴.

²⁸ Dai, Y.; Guo, Y.; Guo, J.; Pease, L.J.; Li, J.; Marcotte, P.A.; Glaser, K.B.; Tapang, P.; Albert, D.H.; Richardson, P.L.; Davidsen, S.K.; Michaelides, M.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1897-1901.

²⁹ Spencer, V. A.; Davie, J.R. *Gene* **1999**, *240*, 1-12.

³⁰ Giannini, G.; Cabri, W.; Fattorusso, C.; Rodriguez, M. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1439-1460.

³¹ Giannini, G.; Battistuzzi, G.; Vignola, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 459-461.

³² Ma, X.; Ezzeldin, H.H.; Diasio, R.B. *Drugs*. **2009**, *69*, 1911-1934.

³³ Holbert, M.A.; Marmonstein R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 673-680.

³⁴ de Ruijter, A.J.M.; van Gennip, A.H.; Caron, H.N.; Kemp, S.; van Kuilenburg, A.B. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 737-749.

Debido a lo desafiante que es el sistema de ensayo de las HDAC, se ha realizado un esfuerzo continuo en el desarrollo de métodos simples y altamente sensibles para seleccionar los inhibidores de enzimas, así como para determinar cuantitativamente sus afinidades de unión (K_d) y sus valores de disociación externa (K_{off}) para evaluar su potencia. Con esta meta, se han desarrollado tanto ensayos de actividad enzimática como métodos competitivos de unión a ligandos en los últimos 7 años³⁵.

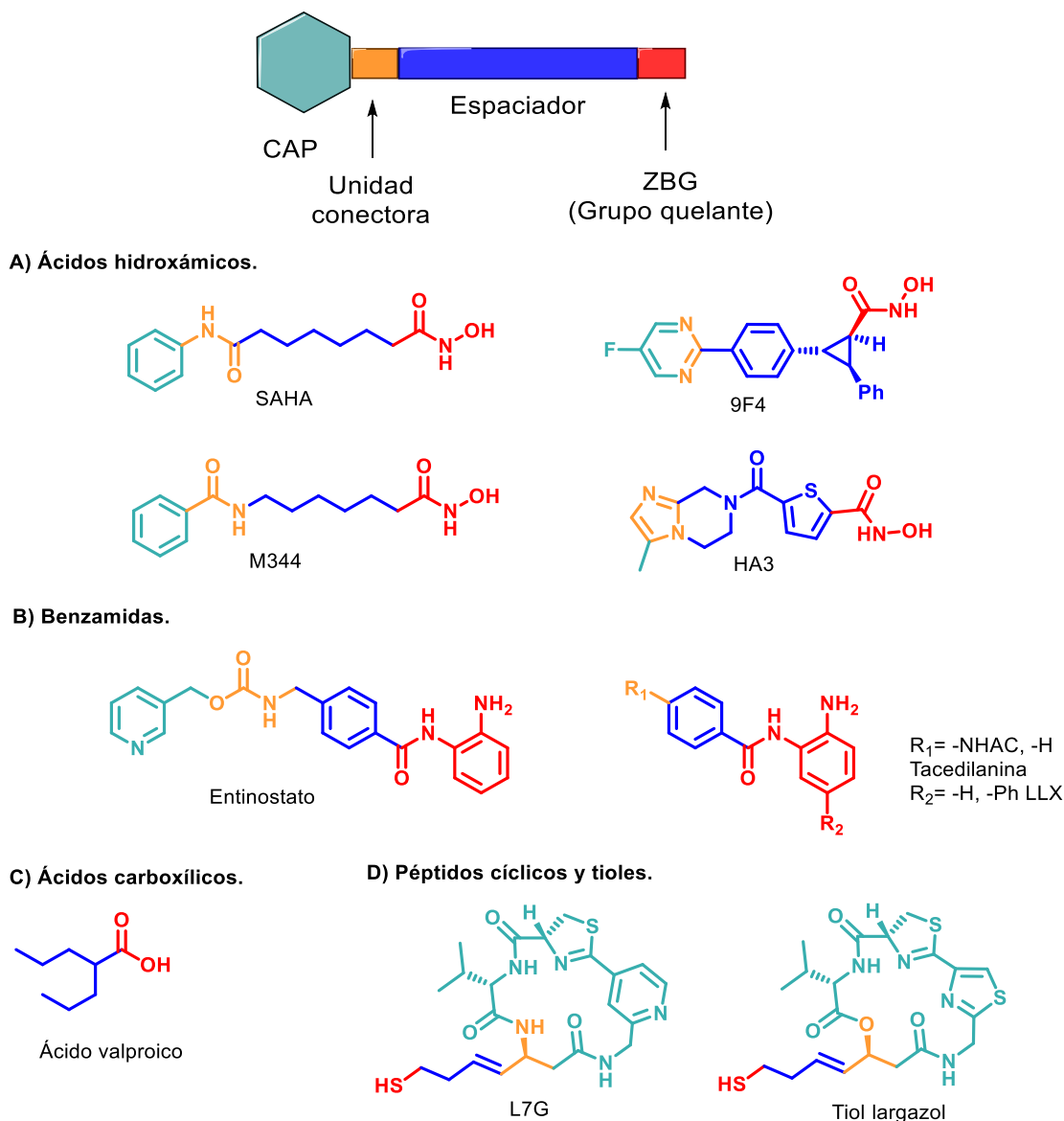


Figura 6. Modelo básico para el diseño de inhibidores de HDACs.

En la bibliografía se encuentran algunos reportes de sustratos fluorescentes con actividad inhibidora de HDACs, resaltan entre ellos los que tienen como base el heterociclo de cumarina, puesto que son los que presentan mejor permeación celular y resistencia al metabolismo

³⁵ Mazitschek, R.; Patel, V.; Wirth, D.F.; Clardy, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2809-2812.

enzimático³⁶. Así, se han usado derivados como los descritos en la Figura 7, siendo a) un sustrato análogo de SAHA, este presenta extinción de fluorescencia al momento de encontrar una isoenzima de HDAC, b) un derivado de cumarina que no presenta extinción de fluorescencia pero tampoco selectividad a algún tipo de isoenzima, y por último c) un derivado de cumarina que presenta fluorescencia al momento de que alguna isoenzima realice la desacetilación del sustrato y posteriormente se lleve a cabo una reacción de sustitución intramolecular³⁷. Para estos tres casos, no se observa selectividad hacia alguna isoenzima de HDACs, por tal motivo, el desarrollo de moléculas que sí lleguen a presentarla sin perder su propiedad fluorescente es un área de aplicación en desarrollo.

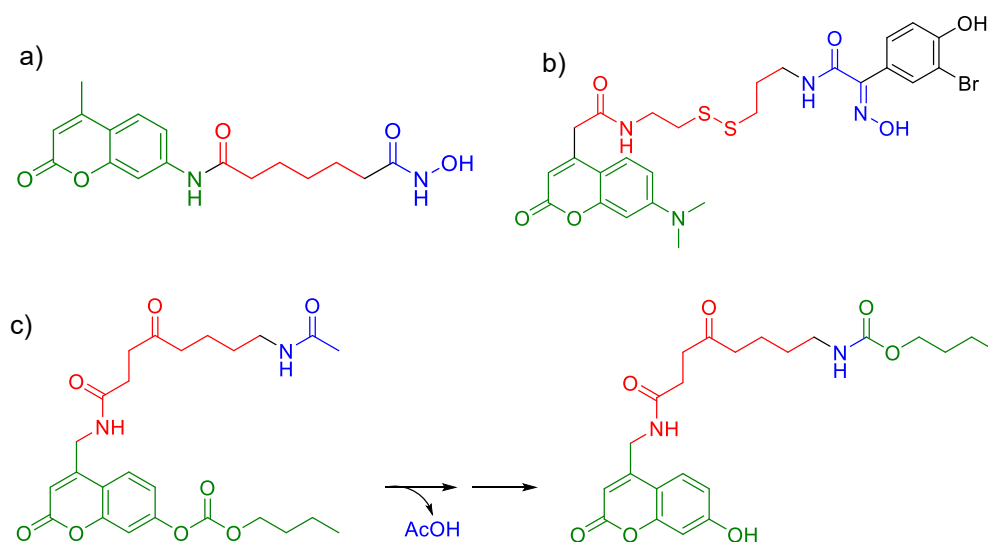


Figura 7. Derivados de cumarina con actividad inhibitora de HDACs y además con propiedades fluorescentes.

³⁶ Singh, R.K.; Mandal, T.; Balasubramanian, N.; Cook, G.; Srivastava, D.K. *Anal. Biochem.* **2011**, *408*, 309-315.

³⁷ Roche, J.; Bertrand, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 451- 483.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de métodos espectroscópicos sencillos, sensibles y de bajo costo que puedan presentar al espectador un fenómeno visible inmediato (sea debido a un cambio estructural en las moléculas, o la afinidad a sustratos enzimáticos involucrados en procesos de interés) resulta necesario.

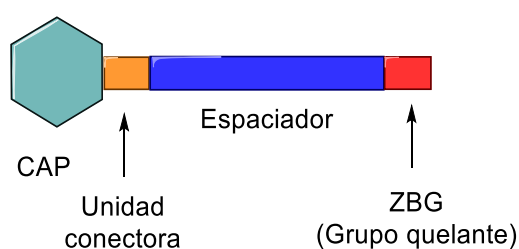
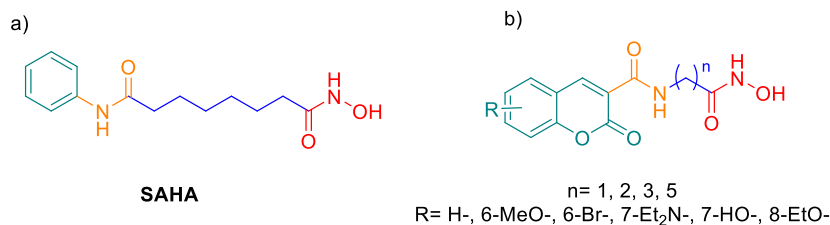
De todos los métodos de análisis, los cambios a simple vista son los más útiles, así como los más económicos. El hecho de que una molécula presente propiedades fluorescentes por una parte de su estructura y tenga actividad biológica específica otorgada por ciertos grupos funcionales en otra, convierte a las moléculas objetivo en estructuras de interés en las áreas de farmacia, bioquímica, y biología molecular.

1.3 HIPÓTESIS

Considerando como variables estructurales el grupo funcional en el anillo aromático y la longitud de cadena espaciadora que conecta a la cumarina con el ácido hidroxámico, se espera que las moléculas pueden presentar actividad inhibitoria de las deacetilasas de histonas provocando un decremento en la actividad proliferativa celular, y además ser selectivas a isoenzimas de HDAC gracias a dichas variables. Por otro lado, derivado de las propiedades fluorescentes y fisicoquímicas de las cumarinas, estas podrán ser rastreadas a nivel celular.

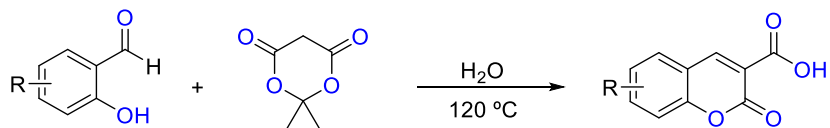
1.4 OBJETIVO GENERAL

Diseño *in silico*, síntesis y evaluación biológica de diferentes moléculas de cumarina sobre líneas de células cancerígenas BT-474, MDA-MB-231 y PC3.

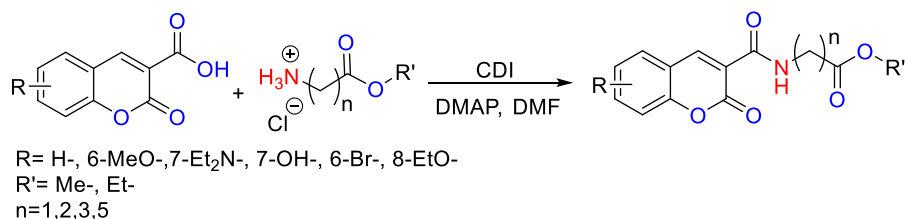


1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

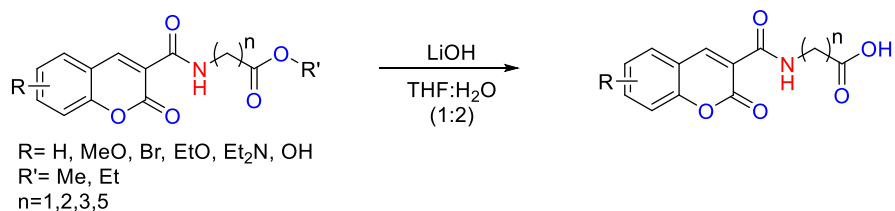
- Diseño *in silico* de los ácidos hidroxámicos y realizar su evaluación *docking*.
- Sintetizar y caracterizar derivados del ácido-3-cumarin-carboxílico.



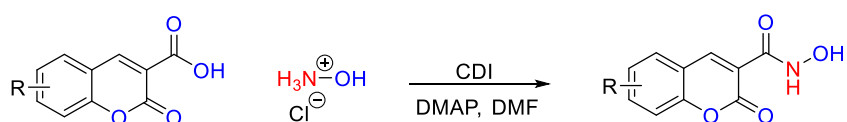
- Sintetizar y caracterizar estructuras de ésteres de amida con diferentes longitudes de cadena alifática.



- Realizar la hidrólisis de los ésteres y caracterizar los ácidos carboxílicos.



- Realizar la síntesis y caracterización de los ácidos hidroxámicos.



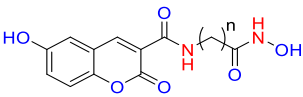
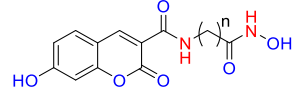
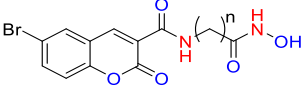
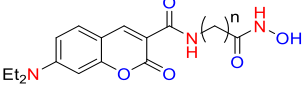
- Evaluar la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, BT-474) y próstata (PC3).

1.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.6.1 DOCKING CIEGO

Como parte del proyecto, se trabajó en conjunto con el grupo de química teórica y computacional de la Universidad de Guanajuato para realizar estudios *docking* con las moléculas propuestas, el blanco biológico seleccionado se obtuvo del *Protein Data Bank* con código PDB 1T69, el cual corresponde a HDAC8 con SAHA como ligando co-cristalizado. Los acoplamientos moleculares se realizaron con el programa *Molegro Virtual Docker V5*, utilizando un tamaño de malla 3 Å y la función de evaluación *MolDock Score*³⁸. Con esta metodología se evaluaron un total de 16 moléculas propuestas con base de cumarina (Tabla 1).

Tabla 1. Moléculas propuestas para realizar *docking* molecular.

Estructura	n	Clave
	1	7OH_1
	2	7OH_2
	3	7OH_3
	5	7OH_5
	1	5ca
	2	5cb
	3	5cc
	5	5cd
	1	5ea
	2	5eb
	3	5ec
	5	5ed
	1	5fa
	2	5fb
	3	5fc
	5	5fd

Se llevaron a cabo una serie de acoplamientos denominados “ciegos” con las moléculas y la proteína como volumen de prueba con el propósito de conocer cuál de las cavidades que se tienen en la proteína es en la que por volumen las moléculas pueden posicionarse. Resultando que todas las moléculas, incluyendo el SAHA, ocupan una posición dentro de la cavidad del sitio activo (Figura 8), se muestran a las estructuras **5fa** en color azul turquesa, 7OH_5 en color blanco, 7OH_1 en color verde, **5cd** en color azul, **5ca** en color rosa, **5cd** en color azul rey, **5ea** en color rojo, **5ed** en color dorado y **SAHA** en color negro, el cofactor zinc es la esfera en color amarillo.

³⁸ Thomsen, R; Christensen, M.H. *J. Med. Chem.* **2006**, *11*, 3315-3321.

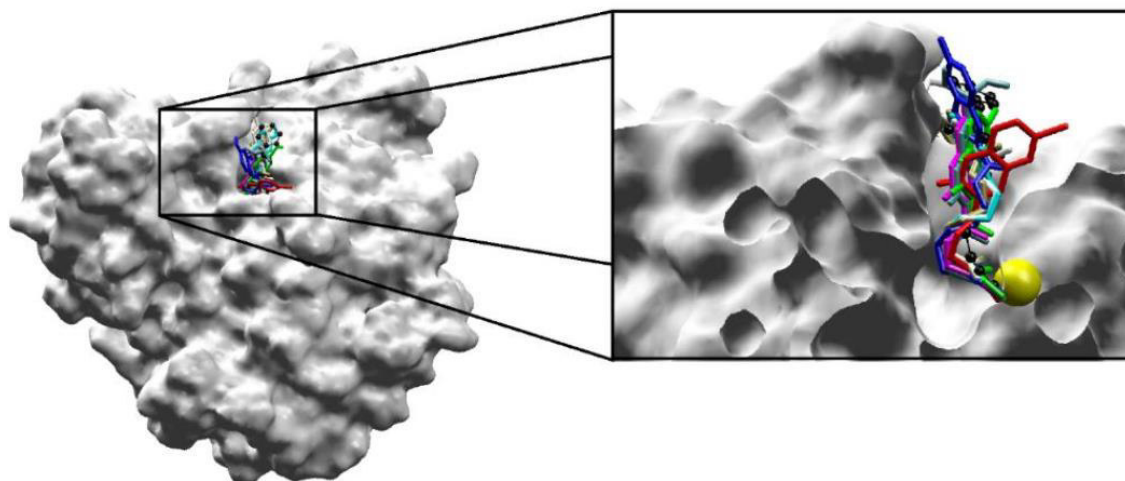


Figura 8. Mejores poses para 8 de 16 diferentes moléculas propuestas junto con SAHA.

Con lo anterior, se realizó el *docking* molecular en la cavidad del sitio activo, este proceso ya no es denominado “ciego” pues se realiza únicamente sobre la cavidad mencionada, y se obtuvieron las Energías de Interacción del Ligando (EIL) con el Zn, con los aminoácidos de la propia cavidad, y las totales (Zn + aminoácidos) (Tabla 2). Es notorio que SAHA presenta la mejor interacción (30.26 kcal) con el zinc, debido en buena medida a la cadena alifática con el grupo hidroxamato que permite el mejor acercamiento al cofactor, para las demás moléculas cuestiones estéricas permiten su aproximación al cofactor pero no tanto como con SAHA. Las moléculas propuestas que tienen 5 átomos en la cadena alifática que sostiene al grupo hidroxamato minimizan el impedimento estérico y presentan una mejor interacción con el zinc. Puede notarse de los resultados que la mejor energía de interacción total se obtiene con el acoplamiento de **5ea**, 112.11 kcal y que las energías de interacción totales de 6 de las moléculas propuestas, a saber, 5fd, 5fc, 5fb, 5ed, 5ea y 5cb son mejores que la Energía de Interacción total de SAHA con HDAC8.

Tabla 2. Energías de interacción de las 16 moléculas y SAHA con HDAC8.

Molécula	EIL — Zn (kcal/mol)	EIL— aminoácidos (kcal/mol)	EIL total-HDAC8 (kcal/mol)
SAHA_	-30.26	-59.18	-89.44
5fd	-25.8	-71.66	-97.46
5fc	-23.73	-68.79	-92.52
5fb	-24.59	-70.89	-95.49
5fa	-19.2	-60.05	-79.25
5ed	-25.89	-69.28	-95.17
5ec	-20.96	-43.12	-64.08
5eb	-19.79	-61.38	-81.17
5ea	-22.43	-89.67	-112.11
5cd	-22.49	-64.79	-87.27

5cc	-24.2	-57.32	-81.52
5cb	-24.41	-67.42	-91.83
5ca	-21.18	-49.19	-70.37
7OH_5	-25.52	-61.29	-86.81
7OH_3	-23.69	-64.52	-88.21
7OH_2	-25.54	-57.34	-82.87
7OH_1	-12.86	-71.4	-84.26

Las moléculas propuestas tienen un grupo hidroxamato y un grupo cumarina unidos por una cadena alifática que consta de 1, 2, 3 ó 5 átomos de carbono; en los casos donde la cadena alifática es de solo un átomo de carbono, los átomos de nitrógeno y oxígeno del hidroxamato quedan muy cerca del átomo de zinc y en posición óptima para formar puentes de hidrógeno con los aminoácidos His 142, His 143 y Gly 151 y aceptores con Tyr 306 (Figura 9). Con base en esto, se propuso la síntesis de estructuras donde el ácido hidroxámico quede unido directamente a la cumarina en la posición 3 de la misma, puesto que podrían presentar mayor interacción con el sitio activo.

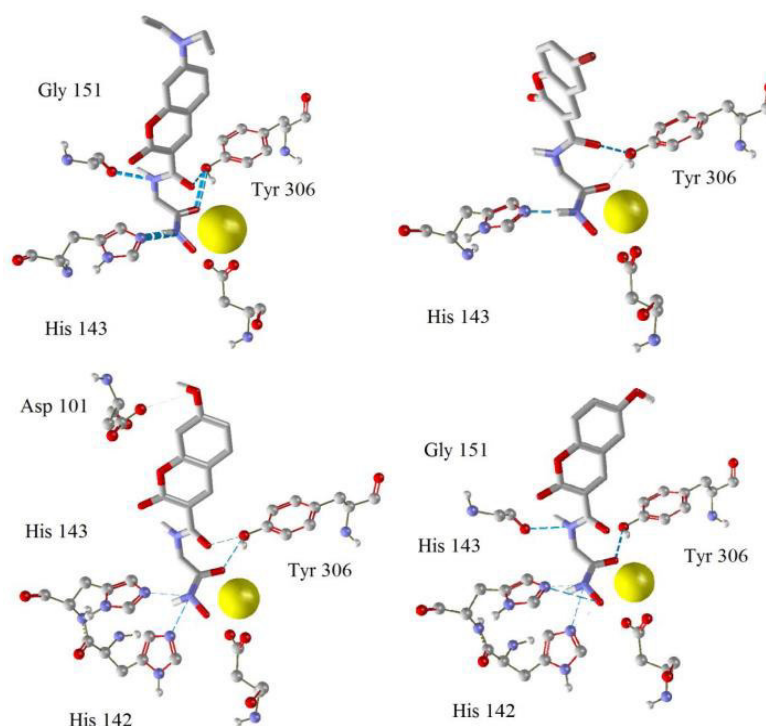
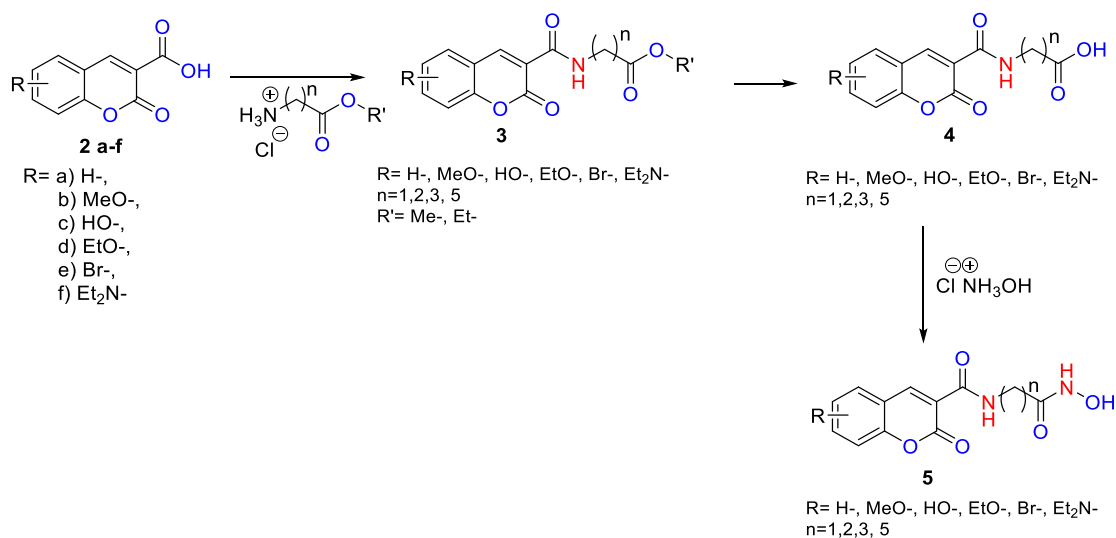


Figura 9. Enlaces de hidrógeno, de izquierda a derecha **5fa**, **5ea**, **5ca** y 7OH_1 presentes al acoplarlos en el sitio activo de HDAC8 (Zinc como una esfera color amarillo).

1.6.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS DE CUMARINA

Teniendo en cuenta estos datos, que nos permiten fortalecer la hipótesis donde las moléculas propuestas tendrán actividad como inhibidoras de HDAC se postuló una ruta de síntesis descrita

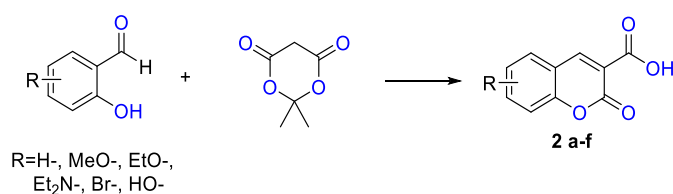
en el Esquema 1, donde se planteó obtener moléculas análogas al SAHA tomando como referencia la longitud de su cadena de carbonos.



Esquema 1. Ruta de síntesis para la formación de ácidos hidroxámicos unidos a cumarina.

La síntesis de la cumarina con el ácido carboxílico en posición 3, se realizó de acuerdo con lo reportado por Song *et al.* y Maggie *et al.*^{39,40}, utilizando como reactivos los correspondientes aldehídos y el ácido de Meldrum (Tabla 3), esta metodología se encontró tolerante a una amplia variedad de grupos funcionales, por tanto se pudieron sintetizar las materias primas (**1 a 6**) en tiempos de reacción cortos y con rendimientos moderados a buenos (74-90%), así como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimientos de la síntesis de las materias primas.^a



Exp. No.	R	t(h)	R (%)
1	01 H-	5	82
2	02 6-MeO-	5	90
3	03 6-Br-	8	80
4	04 8-EtO-	5	74

³⁹ Song, A.; Wang, X.; Lam, K. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 1755-1758.

⁴⁰ Maggi, R.; Bigi, F.; Carloni, S.; Mazzacania A.; Sartoria, G. *Green Chem.*, **2001**, *3*, 173-174.

5	05	7-Et ₂ N-	8	85
6	06	7-HO-	8	90

^aCondiciones de reacción: 1 mol de aldehído, 1.2 mol ácido de Meldrum, H₂O, 100 °C, 8 h.

La purificación de los productos se realizó mediante la filtración del precipitado formado durante la reacción y sucesivos lavados con agua. En la Figura 10 se puede observar el crudo de reacción del compuesto **4** en resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H). Dónde las señales que nos indican la formación del producto, son H-4 y H-3a las cuales están localizadas en 8.91 y 12.32 ppm respectivamente, y corresponden cada una al protón vinílico del anillo de 2H-pirano y al ácido carboxílico del compuesto presentado.

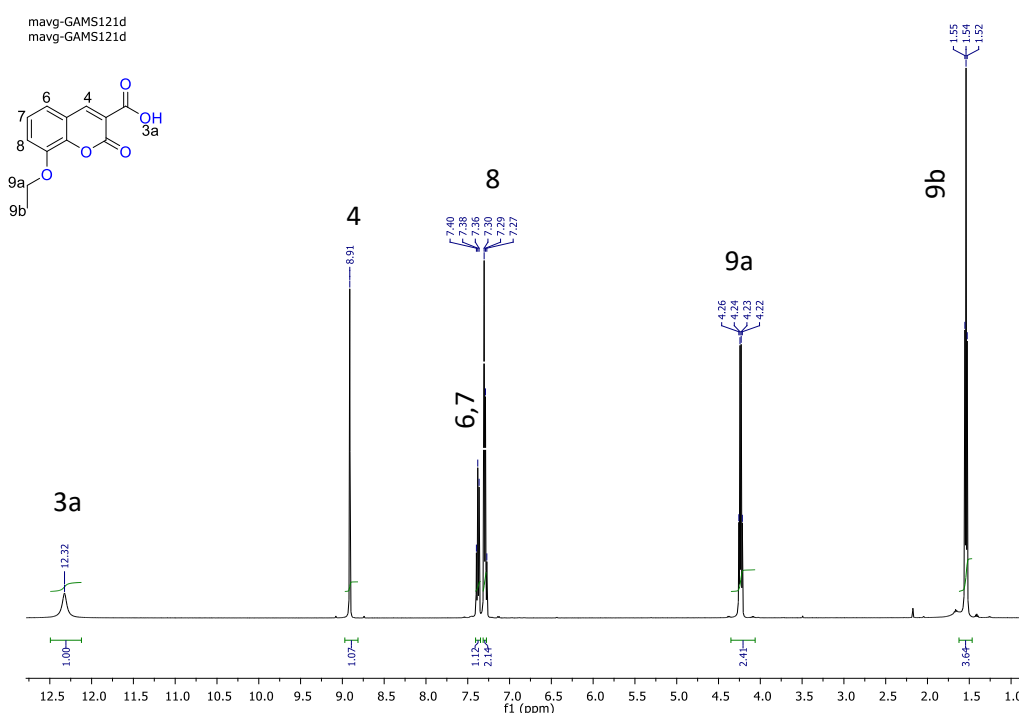


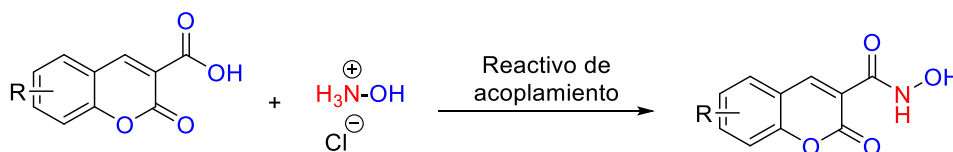
Figura 10. Espectro de RMN-¹H de la molécula **4** en CDCl₃ 500MHz.

Continuando con el objetivo, se buscó en la literatura una metodología que permitiera la formación del grupo funcional de ácido hidroxámico en la posición 3 de la cumarina. Se encontraron diversas condiciones de reacción, que incluían desde temperaturas elevadas hasta las que implicaban el uso de reactivos de acoplamiento.

Debido a que la gran mayoría de los reportes que involucran a los reactivos de acoplamiento, concuerdan con condiciones de reacción suaves (temperatura ambiente, tiempos de reacción cortos, etc.) se optó por probarlos. De esta forma, se buscó en la literatura condiciones de reacción que involucraran diferentes reactivos como el TBTU, DCC y CDI; y los disolventes más comunes utilizados para estas reacciones: THF, CH₂Cl₂, y DMF. En la Tabla 4 se resumen los experimentos realizados para la síntesis de los derivados de ácido hidroxámico

correspondientes, dejándose en un tiempo de 8 h como referencia y utilizando dimetilaminopiridina como catalizador, según lo reportado por Giacomelli *et al*⁴¹.

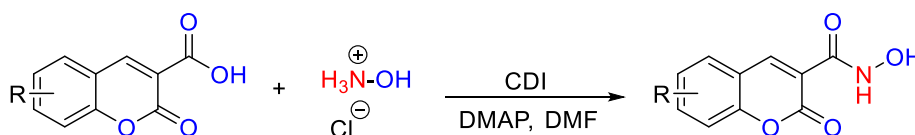
Tabla 4. Condiciones de reacción para la síntesis de ácidos hidroxámicos.



Exp.	R	Disolvente	Reactivo de Acoplamiento	Observaciones
1			DCC	No se consume materia prima
2		THF	CDI	Descomposición
3			TBTU	No se consume materia prima
4			DCC	Formación de muchos subproductos
5	H-	CH ₂ Cl ₂	CDI	Formación de muchos subproductos
6			TBTU	Formación de muchos subproductos
7			CDI	Transformación completa
8		DMF	DCC	Formación del anhídrido
9			TBTU	No se consume materia prima

Una vez encontradas las condiciones para la reacción acoplamiento (Entrada 7 en Tabla 4), se realizaron los experimentos con el resto de los derivados, los resultados se resumen en la Tabla 5. Los bajos rendimientos se atribuyen al proceso de purificación, al ser ácidos puede que una parte se encuentre en forma ionizada, haciéndolos así solubles en agua, una estrategia utilizada para intentar aumentar el rendimiento fue adicionar ácido clorhídrico concentrado a la solución y observar si precipitaba más compuesto, cosa que no ocurrió.

Tabla 5. Rendimientos de la reacción para la obtención de los ácidos hidroxámicos.^a



Exp. No.	R	t(h)	R (%)
1 07	H-	.25	40
2 08	6-MeO-	.25	38
3 09	6-Br-	.5	15

⁴¹ Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Salaris, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2715-2717.

4	12	8-EtO-	1	24
5	11	7-Et ₂ N-	.5	20
6	10	7-HO-	1	40

^a Condiciones de reacción: Cumarina (1 mol), NH₂OH·HCl (1.2 mol), CDI (1.2 mol), DMAP (0.05 mol), DMF, rt, 12-18 h.

Para llevar a cabo la caracterización de los derivados se intentó usar RMN, pero la poca solubilidad de los compuestos inclusive en DMSO-*d*₆, hizo difícil la caracterización mediante esta técnica. En la bibliografía existen reportes específicos con las características del ácido hidroxámico, así según lo reportado por Artemenko *et al*⁴², se utiliza el infrarrojo (IR) como herramienta para dicho propósito, puesto que los ácidos hidroxámicos presentan bandas de absorción características alrededor de 3260-3300 cm⁻¹ correspondientes al -NH-, y 2780-2980 cm⁻¹ para el -OH. Por esta razón se obtuvieron los espectros de IR de las moléculas sintetizadas (Figura 11) y también se usó espectrometría de masas para corroborar la masa exacta de los ácidos hidroxámicos, usando como una referencia un compuesto de peso molecular 299.2944 g/mol (Figura 12). En los espectros de IR se puede observar la presencia de las bandas mencionadas, pero lo que nos ayuda a corroborar la existencia de las moléculas **7** a **12**, son los espectros de masas, que nos dan los valores esperados a la masa calculada para las moléculas.

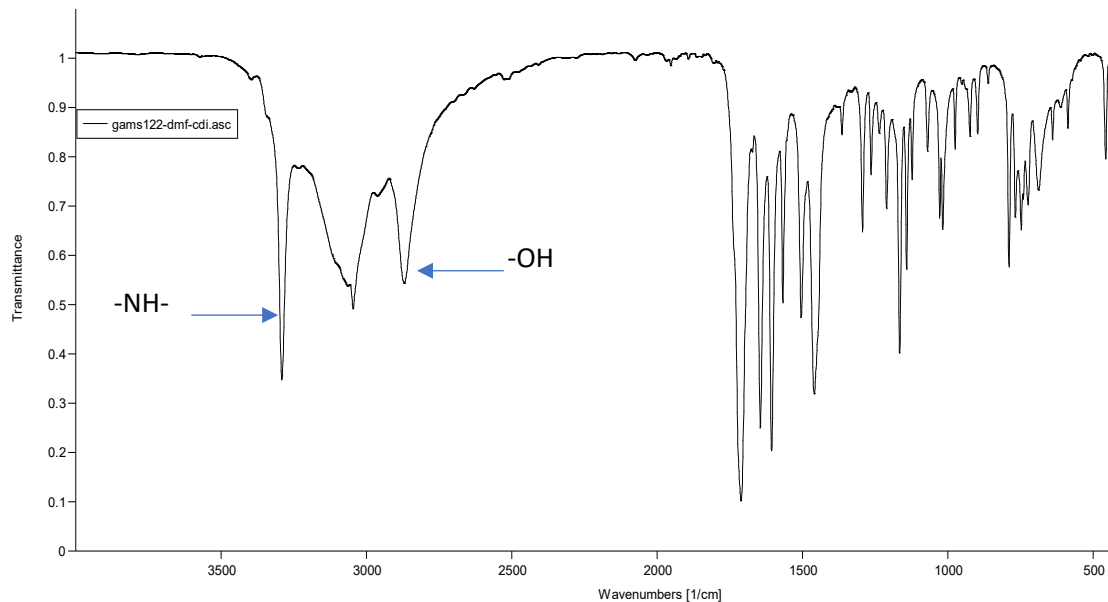
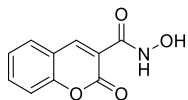


Figura 11. Espectro de IR de la molécula **7** en KBr.

⁴² Artemenko, A.I.; Anufriev, E.K.; Tikunova, I.V. *Zhur. Prik. Spekt.*, **1979**, *32*, 641-647.



PM esperado= 206.0375

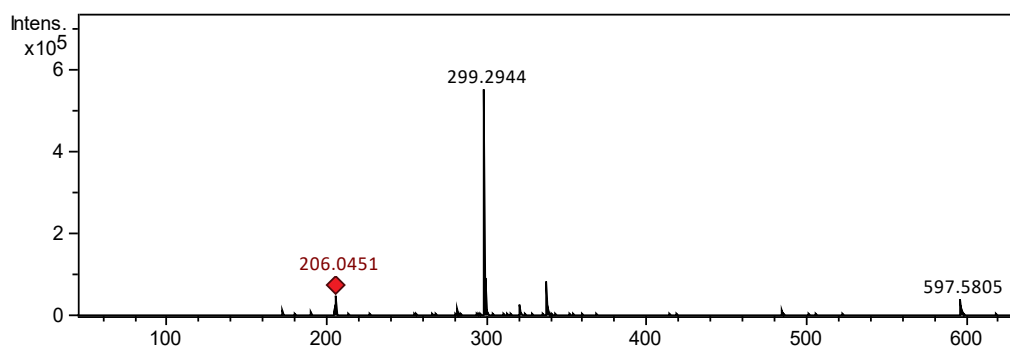
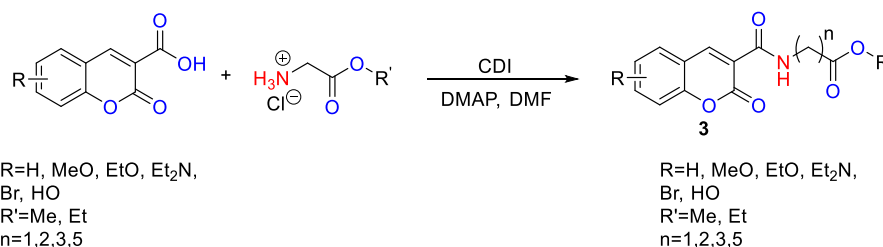


Figura 12. Espectro de masas para la molécula 7 ESI (+).

En la Tabla 6 se enlistan los rendimientos obtenidos, que van desde moderados a buenos (36-96%) para el resto de los derivados, se usaron las mismas condiciones de reacción que para el acoplamiento con hidroxilamina (condiciones en Tabla 5), lo único que cambió fue el tiempo de reacción, consumiéndose la materia prima en un periodo de 6 a 8 h.

Tabla 6. Rendimientos de la reacción de acoplamiento para la formación de amidas.^a



Exp. No.	R	n	R'	Rendimiento (%)
1	13	1	-Me	84
2	14	2	-Et	60
3	15	3	-Et	85
4	16	5	-Me	96
5	17	1	-Me	81
6	18	2	-Et	62
7	19	3	-Et	89
8	20	5	-Me	90
9	21	1	-Me	40
10	22	2	-Et	36
11	23	3	-Et	52
12	24	5	-Me	61

13	25	8-EtO-	1	-Me	86
14	26		2	-Et	83
15	27		3	-Et	88
16	28		5	-Me	68
17	29	6-Br-	1	-Me	46
18	30		2	-Et	58
19	31		3	-Et	76
20	32		5	-Me	77
21	33	7-HO-	1	-Me	85
22	34		2	-Et	75
23	35		3	-Et	81
24	36		5	-Me	81

^a Condiciones de reacción: Cumarina (1 mol), Hidrocloruro (1.2 mol), CDI (1.2 mol), DMAP (0.05 mol), DMF, rt, 6-8 h.

En la Figura 13 se muestra el espectro de hidrógeno de uno de los derivados sintetizados de amida con el ácido carboxílico de cumarina sin sustituyentes (experimento 1, molécula **13**). Para esta serie de moléculas las señales que son importantes son, las señales que corresponden al hidrógeno H-4, el cual pertenece al protón vinílico de la cumarina, H-3a correspondiente al nitrógeno de la amida, y las señales correspondientes a los metil ó etil ésteres. En la Tabla 7 se enlistan los desplazamientos químicos de los hidrógenos representativos para las moléculas sintetizadas.

mavg-gams123-180615

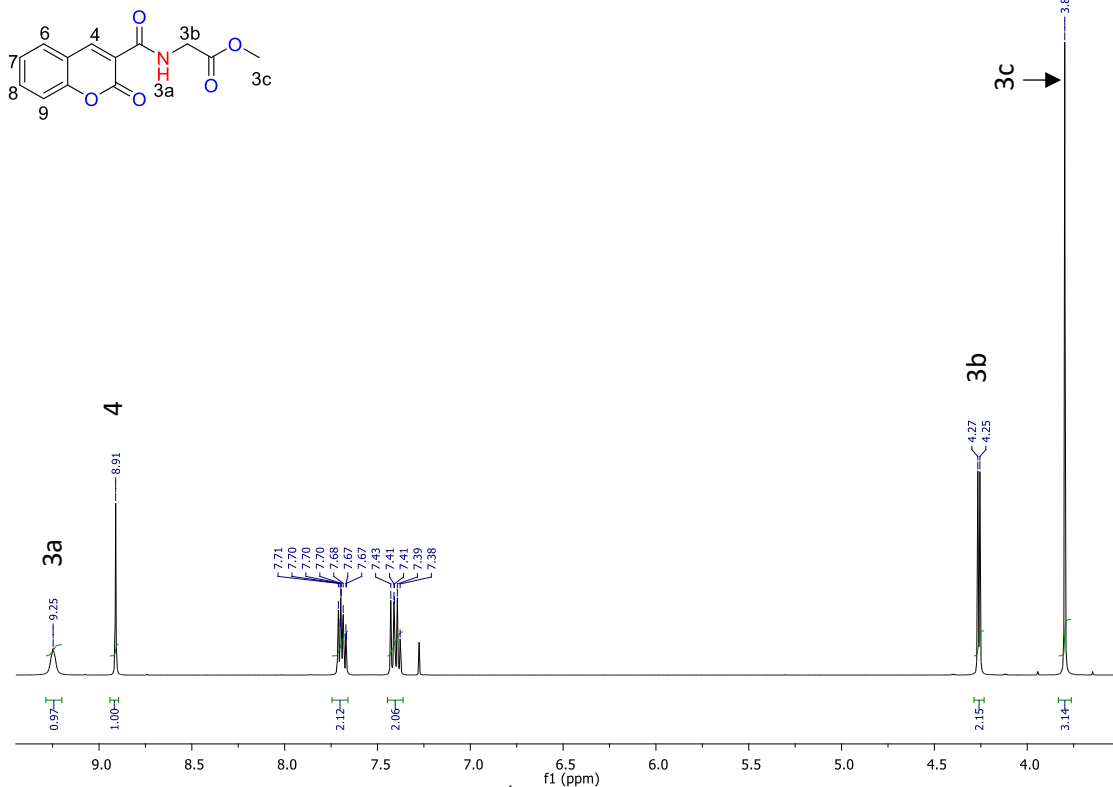


Figura 13. Espectro de RMN-¹H en CDCl₃ de la molécula **13**, 500 MHz.

Tabla 7. Desplazamientos en RMN-¹H en ppm para las amidas sintetizadas.

Exp.	No.	R	n	δ H4	δ H3a	δ -Me	δ -Et	
							q	t
1	13	H-	1	8.91	9.25	3.80	-	-
2	14		2	8.90	9.14	-	4.20	1.29
3	15		3	8.91	8.87	-	4.15	1.26
4	16		5	8.91	8.83	3.67	-	-
5	17	6-MeO-	1	8.86	9.30	3.79	-	-
6	18		2	8.85	9.19	-	4.20	1.29
7	19		3	8.86	8.92	-	4.15	1.26
8	20		5	8.86	8.88	3.67	-	-
9	21	7-Et ₂ N-	1	8.60	8.94	3.59	-	-
10	22		2	8.69	9.08	-	4.19	1.29
11	23		3	8.70	8.86	-	4.15	1.26
12	24		5	8.70	8.80	3.67	-	-
13	25	8-EtO-	1	8.87	9.28	3.79	-	-
14	26		2	8.87	9.16	-	4.20	1.29
15	27		3	8.88	8.90	-	4.15	1.26
16	28		5	8.88	8.86	3.67	-	-
17	29	6-Br-	1	8.83	9.29	3.80	-	-

18	30		2	8.82	9.09	-	4.20	1.29
19	31		3	8.83	8.80	-	4.15	1.26
20	32		5	8.84	8.75	3.67	-	
21	33	7-HO-	1	8.83	9.02	3.68	-	
22	34		2	8.83	8.87	-	4.09	1.20
23	35		3	8.78	8.66	-	4.05	1.19
24	36		5	8.77	8.63	3.57	-	

Otra técnica de RMN utilizada para confirmar la estructura fue la obtención del espectro de ^{13}C , que nos da los datos del desplazamiento tanto de los carbonos carbonílicos como del carbonilo de la amida (170-174 ppm y 160-164 ppm respectivamente). En la Figura 14 se representa el espectro de carbono de la molécula **13**, y en la Tabla 8 se enlistan los desplazamientos químicos de los carbonos representativos para las moléculas sintetizadas, siendo el caso de C4, C3a y para los ésteres de metilo y etilo, mientras que en las entradas 9 y 11 no se lograron obtener los espectros correspondientes debido a su poca solubilidad y consecuente solidificación en el tubo de RMN.

mavg-gams123-180615

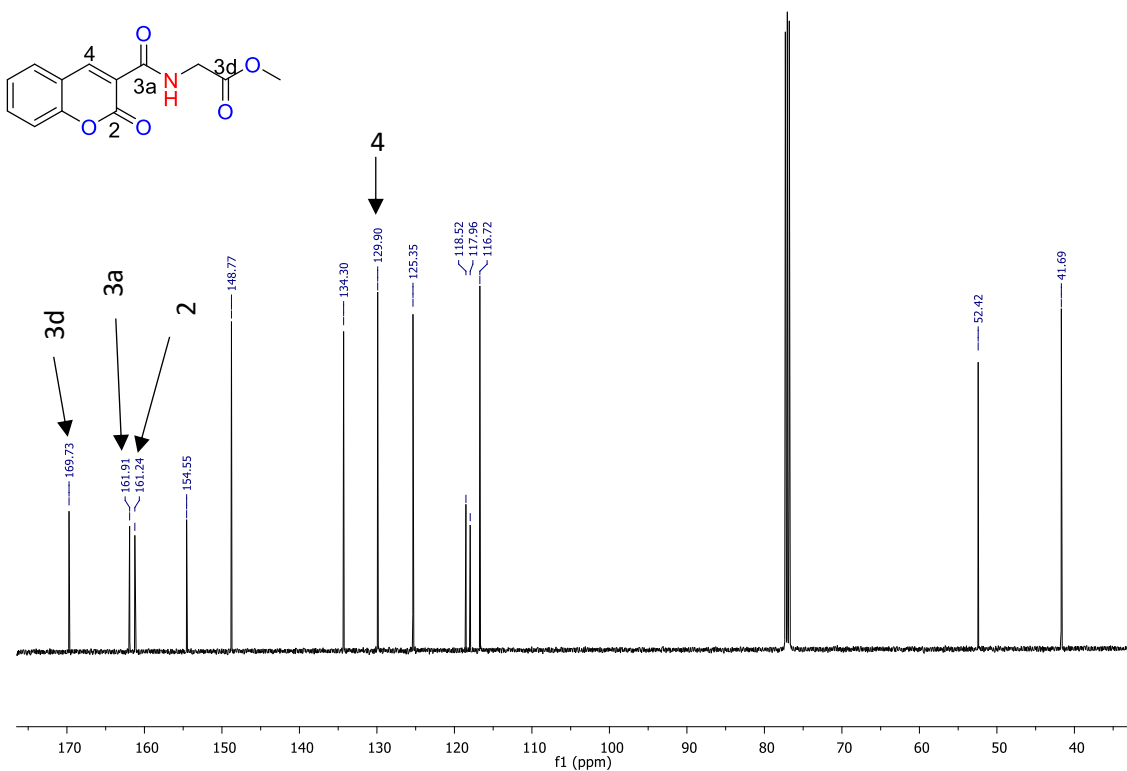


Figura 14. Espectro de RMN- ^{13}C en CDCl_3 de la molécula **13**, 125 MHz.

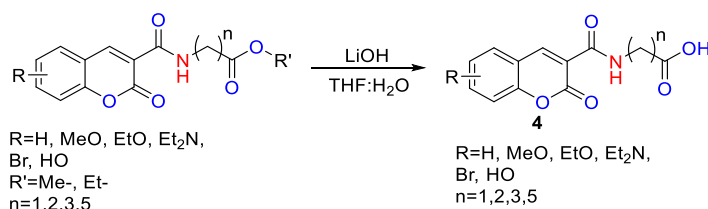
Tabla 8. Desplazamientos en RMN-¹³C en ppm para las amidas sintetizadas.

Exp.	No.	R	n	δ C2	δ C4	δ C3a	δ Carbonilo de Éster
1	13	H-	1	161.24	148.77	161.91	169.73
2	14		2	161.26	148.36	161.59	171.77
3	15		3	161.47	148.39	161.64	172.97
4	16		5	161.45	148.26	161.49	174.02
5	17	6-MeO-	1	161.37	148.55	162.00	169.73
6	18		2	161.39	148.26	161.18	171.76
7	19		3	161.57	148.14	161.70	172.95
8	20		5	161.51	148.02	161.60	173.99
9	21	7-Et ₂ N-	1	-	-	-	-
10	22		2	162.61	148.09	163.25	171.94
11	23		3	-	-	-	-
12	24		5	162.80	148.01	163.08	174.08
13	25	8-EtO-	1	160.92	148.99	162.00	169.68
14	26		2	160.94	148.60	161.69	171.67
15	27		3	161.13	148.59	161.72	172.93
16	28		5	161.17	148.46	161.52	173.96
17	29	6-Br-	1	160.59	147.40	161.39	169.63
18	30		2	160.58	147.00	161.06	171.76
19	31		3	160.79	147.00	161.09	172.91
20	32		5	160.84	146.89	160.91	173.98
21	33	7-HO-	1	162.39	149.08	164.35	170.57
22	34		2	162.02	148.66	164.22	171.97
23	35		3	162.13	148.37	164.05	173.03
24	36		5	161.91	148.37	164.05	173.77

Para todas las moléculas sintetizadas se observa una tendencia en el incremento de la solubilidad al aumentar la cadena alifática. Para la siguiente etapa, se buscó una metodología adecuada para la hidrólisis de los ésteres y así formar los respectivos ácidos carboxílicos; para dicho propósito se utilizó la metodología planteada por Mertens y Gütschow⁴³, donde se emplea hidróxido de litio en medio acuoso. En la Tabla 9, se enlistan los tiempos de reacción y los respectivos rendimientos, para la reacción de hidrólisis planteada.

⁴³ Mertens, M.; Gütschow, M. *Synthesis*, **2014**, *46*, 2191-2200.

Tabla 9. Rendimientos y tiempos de reacción para la hidrólisis de los derivados de amida.^a



Exp.	No.	R	n	R'	t (h)	%R
1	37	H-	1	Me-	12	93
2	38		2	Et-		70
3	39		3	Et-		75
4	40		5	Me-		80
5	41	6-MeO-	1	Me-	24	72
6	42		2	Et-		88
7	43		3	Et-		81
8	44		5	Me-		84
9	45	7-Et ₂ N-	1	Me-	12	80
10	46		2	Et-		80
11	47		3	Et-		89
12	48		5	Me-		70
13	49	8-EtO-	1	Me-	24	40
14	50		2	Et-		88
15	51		3	Et-		92
16	52		5	Me-		83
17	53	6-Br-	1	Me-	24	87
18	54		2	Et-		40
19	55		3	Et-		97
20	56		5	Me-		93

^a Condiciones de reacción: Éster (1 mol), LiOH (6 mol), THF:H₂O (1:2), rt, 12-24 h.

En la Figura 15, se muestra el espectro de RMN-¹H del derivado con el sustituyente EtO- (Entrada 1) molécula **49**. Se observa la aparición del hidrógeno del ácido carboxílico en 12.83 ppm y se conserva la multiplicidad de las señales de la amida y el metileno correspondiente a la cadena alifática, así como también se observa que la señal del protón vinílico del anillo de cumarina aparece en 8.86 ppm, corroborando que no hubo apertura de este en las condiciones usadas para la hidrólisis básica.

mavg-gams145a-041015

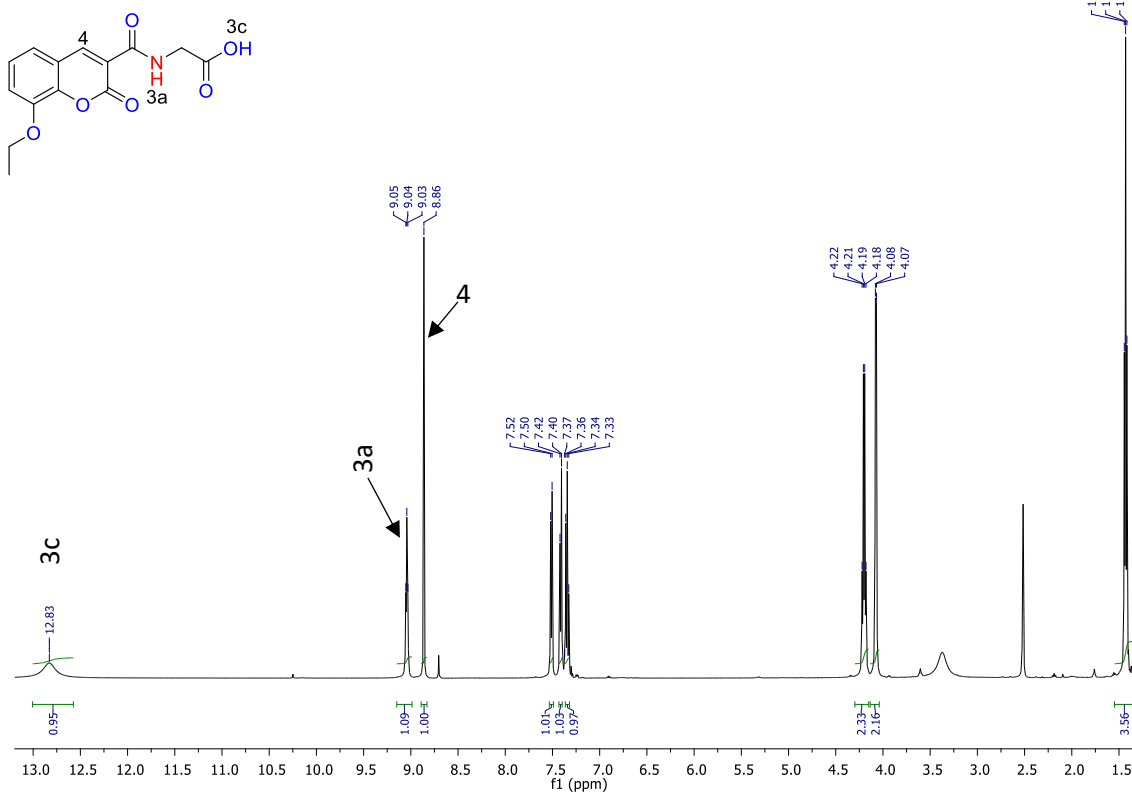


Figura 15. Espectro de RMN-¹H en DMSO-*d*₆ de la molécula 49, 500 MHz.

La estructura de las moléculas también es confirmada mediante los espectros de RMN-¹³C, apareciendo los carbonos carbonílicos de los ácidos carboxílicos y el carbonilo de la amida en los desplazamientos químicos esperados. En la Figura 16 se representa el espectro de carbono del compuesto 37 y en la Tabla 10 se enlistan los desplazamientos químicos de los carbonos representativos siendo el caso de C2, C4, C3a, y para los correspondientes ácidos de todos los derivados.

mavg-gams142a-070815

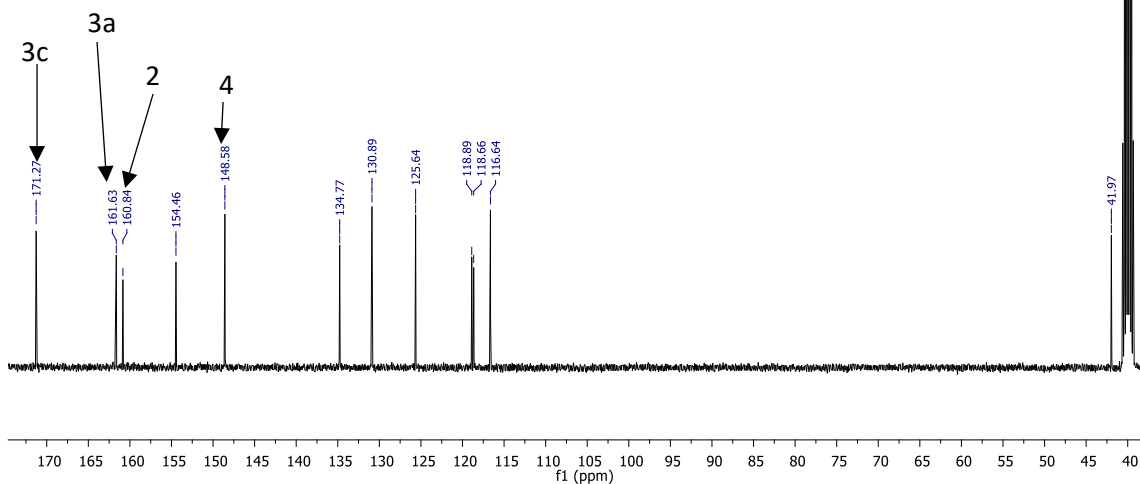
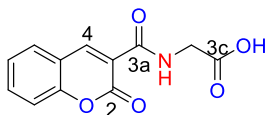


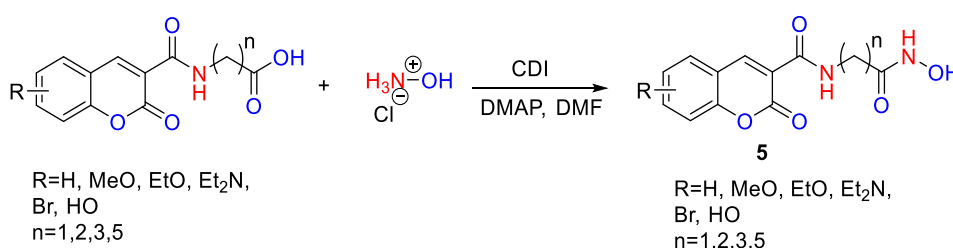
Figura 16. Espectro de RMN-¹³C en DMSO-*d*₆ para la molécula **37**, 500 MHz.

Tabla 10. Desplazamientos en RMN-¹³C en ppm de los nuevos ácidos carboxílicos.

Exp.	No.	R	n	δ C2	δ C4	δ C3a	δ Carbonilo de Ácido
1	37	H-	1	160.84	148.58	161.63	171.27
2	38		2	160.86	148.14	161.46	173.58
3	39		3	160.73	147.64	161.68	174.55
4	40		5	160.85	147.72	162.48	174.86
5	41	6-MeO-	1	160.87	148.01	161.45	173.25
6	42		2	160.95	147.97	161.45	173.53
7	43		3	160.88	147.54	161.66	174.54
8	44		5	160.98	147.61	161.45	174.85
9	45	7-Et ₂ N-	1	161.42	147.53	161.53	172.94
10	46		2	162.51	148.57	163.01	174.02
11	47		3	162.58	148.45	163.11	175.02
12	48		5	163.10	148.32	163.46	174.15
13	49	8-EtO-	1	160.59	148.77	161.61	171.22
14	50		2	160.60	148.33	161.45	173.53
15	51		3	160.53	147.90	161.66	174.54
16	52		5	160.63	147.93	161.46	174.84

17	53	6-Br-	1	160.33	147.25	161.33	171.16
18	54		2	160.35	146.79	161.16	173.50
19	55		3	160.21	146.30	161.39	174.54
20	56		5	160.32	146.37	161.18	174.84

Con el grupo terminal modificado, la propiedad de solubilidad se ve drásticamente afectada para todas las moléculas, haciéndolas más solubles en solventes polares como el DMSO. Una vez obtenido el ácido carboxílico, se aplicó la misma metodología para la formación de las amidas (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de ácidos hidroxámicos a partir de ácidos carboxílicos.

En la Figura 17, se muestra una comparación entre los espectros de carbono de los carbonilos del ácido carboxílico y el hidroxámico. Los datos que se buscan son el desplazamiento del carbono carbonílico del ácido carboxílico a campo alto al convertirse en ácido hidroxámico, por su parte el espectro de RMN-¹H, no arroja mucha información, puesto que los protones ácidos se intercambian, pero nos quedan las señales correspondientes al -NH de la amida en 8.7 ppm y el protón vinílico de la cumarina en 8.8 ppm.

Por otro lado, analizando el espectro de RMN-¹³C existe un desplazamiento de la señal del carbonilo hacia campo alto, la señal es fácilmente distinguible de cualquier otro tipo de carbonilo (éster o aldehído), se marca también el desplazamiento de las señales de los metilenos de la cadena alquílica. En la Tabla 11, se enlistan los desplazamientos de los carbonilos de los ácidos hidroxámicos.

Las mejores técnicas de caracterización para estas moléculas fueron RMN-¹³C, IR, y espectrometría de masas, puesto que los espectros de hidrógeno varían mucho en cuanto a la aparición del protón correspondiente al hidroxilo del ácido hidroxámico, en algunos aparece y en otros no; además el espectro de carbono logra mostrar el desplazamiento químico esperado a campos más altos que el carbono correspondiente al ácido carboxílico, y en IR se logra observar las bandas características del grupo funcional. Por último, gracias a la espectrometría de masas se observan las masas exactas de las moléculas sintetizadas esperadas.

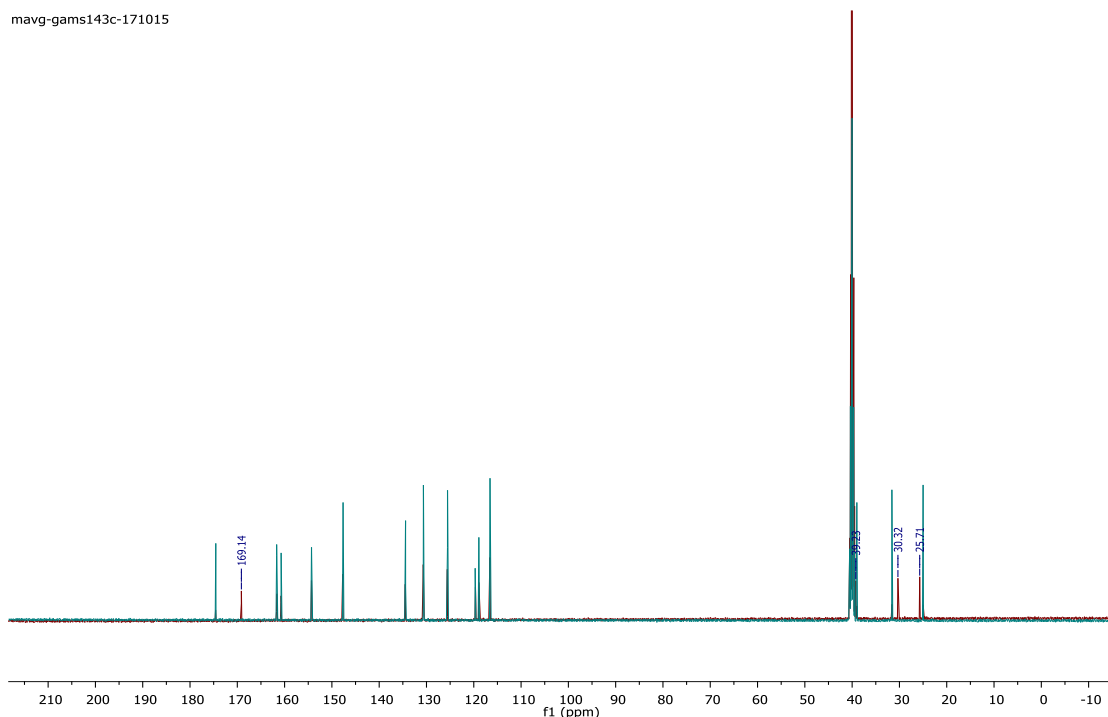


Figura 17. Comparación de espectros de RMN- ^{13}C de las moléculas **39** (Azul) y **59** (rojo) en DMSO- d_6 125 MHz.

Tabla 11. Desplazamientos en RMN- ^{13}C en ppm para los carbonilos de los ácidos hidroxámicos.

Exp.	No.	R	n	δ Carbonilo de -NHOH
1	57	H-	1	165.66
2	58		2	167.68
3	59		3	169.14
4	60		5	169.50
5	61	6-MeO-	1	165.58
6	62		2	167.78
7	63		3	169.09
8	64		5	169.50
9	65	6-Br-	1	165.55
10	66		2	167.16
11	67		3	169.14
12	68		5	169.41
13	69	7-Et ₂ N-	1	165.86
14	70		2	167.85
15	71		3	169.15
16	72		5	170.95
17	73	8-EtO-	1	165.65
18	74		2	168.89

19	75	3	169.11
20	76	5	170.11

1.6.3 EVALUACIÓN ANTIPROLIFERATIVA

Los experimentos correspondientes a la actividad biológica se realizaron en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán ubicado en la Ciudad de México, con el grupo de investigación de la Dra. Rocío Ángeles García Becerra.

Con las moléculas puras y caracterizadas, se evaluó su efecto en la proliferación de células cancerosas de mama y próstata. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de los compuestos por un tiempo de 3 a 6 días dependiendo de la línea celular, la respuesta antiproliferativa se evaluó mediante un ensayo de Sulforodamina B (SRB), y se utilizó como molécula de referencia el SAHA. Como se esperaba, SAHA inhibió la proliferación celular de forma dosis-dependiente para todas las líneas celulares. Por otra parte, la sensibilidad de las células a los análogos varió dependiendo de la estructura química de los mismos. En general, la mayoría de estos exhibió una actividad antiproliferativa efectiva.

Las líneas celulares de mama (BT-474, MDA-MB-231) y próstata (PC3) (ATCC, Manassas, VA, USA) se mantuvieron en atmósfera humificada con un 5% de CO₂ a 37°C, siguiendo las indicaciones del proveedor.

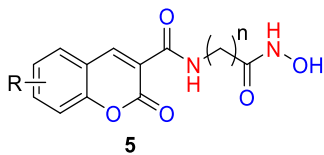
- Ensayo de Sulforodamina B (SRB).

Las células se sembraron en placas de 96 pozos con una densidad de 3000 células por pozo, y fueron expuestas a diferentes concentraciones de los compuestos (**57** a **76**). Se incubaron a 37 °C en un ambiente húmedo (composición 95% aire 5% CO₂) durante un periodo de 72 h a 144 h dependiendo de la línea celular. Terminando el tiempo de incubación las células se trataron con ácido tricloroacético 10% a 4 °C por 1h. Después, se lavaron los pozos y las células se tiñeron con una solución 0.4% SBR 1% ácido acético por 1 h. Para remover el exceso de colorante los pozos se lavaron 4 veces con ácido acético 1% y se secaron al aire. La proteína soluble teñida se solubilizó con una solución [tris(hidroxi-metil)aminometano] 10 mM. Por último, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas (BioTek, Winooski, VT, USA).

Basándose en los efectos de la inhibición de crecimiento causadas por los compuestos sintetizados a la concentración de 10 µM, los compuestos **60**, **64**, **76**, **68** y **70** mostraron una actividad comparable al SAHA, mientras que los compuestos **58** y **66** fueron menos potentes (Tabla 12). La sensibilidad de las células a los compuestos fue: En la línea celular BT-474: **60** > **68** > **76** > **64** > **70** > **66** > **58** > **63** > **57** > **72** > **65**; en la línea celular MDA-MB-231: **76** > **68** > **64** > **60** > **70** > **66** > **58** > **57** > **63** > **65** > **72**; y en la línea celular PC3: **76** > **68** > **64** > **60** > **70** > **66** > **58** > **57** > **63** > **72** > **65**. Cabe resaltar que las células de cáncer de mama fueron más sensibles a los compuestos que las células de cáncer de próstata. De forma interesante, todos los compuestos con sustituyente H- (**60**), MeO- (**64**), EtO- (**76**), Br- (**68**) mostraron potente actividad antiproliferativa, mientras que los que tienen sustituyente H- (**57**), MeO- (**63**), Br- (**65**) and Et₂N- (**72**) no modificaron el crecimiento celular. Estos resultados indican que los compuestos **60**, **64**,

76, 68 y 70 son buenos candidatos para continuar evaluándolos como posibles agentes antineoplásicos.

Tabla 12. Efectos en la inhibición de crecimiento (GI%) causados por los compuestos sintetizados en células cancerosas.



5
R=H, MeO, EtO, Et₂N,
Br, HO
n=1,2,3,5

Compuesto (10 μM)			BT-474	MDA-MB-231	PC3
SAHA	R	n	98.22±1.82*	97.54 ± 1.59*	87.86±7.85*
57	H-	1	9.90±7.79	17.39±15.15	11.31±7.65
58		2	40.06±18.94*	47.81±11.06*	22.89±19.30
60		5	95.98±2.61*	91.61±2.49*	68.82±22.14*
63	6-MeO-	3	33.24±15.25	16.57±8.78	8.97±16.21
64		5	82.08±25.72*	92.28±5.43*	71.02±11.55*
76	8-EtO-	5	91.88±12.54*	100.08±0.29*	88.62±14.78*
65	6-Br-	1	6.73±7.40	14.00±7.13	5.10±8.93
66		2	61.83±11.82*	64.30±17.82*	32.64±14.31
68		5	93.47±4.29*	93.64±3.27*	75.85±16.43*
70	7-Et ₂ N-	2	70.84±18.62*	78.50±5.79*	53.02±13.35*
72		5	7.05±13.26	0.00±3.9	7.69±21.95

Los resultados son expresados como la media (±S.D.) del porcentaje de inhibición de crecimiento de las determinaciones por triplicado y representan al menos tres diferentes experimentos *p<0.05 vs. vehículo.

- Efectos de los compuestos en la expresión de genes regulatorios del ciclo celular.

Esta reportado que SAHA inhibe la proliferación al inducir la interrupción del ciclo celular y la apoptosis de células cancerosas de mama y próstata, en gran parte por regularización de proteínas de interrupción del ciclo y apoptosis, por ejemplo, la quinasa dependiente de ciclina (CDK), o inhibiendo p21, p53 y Ciclina D1⁴⁴. Entonces, el efecto de los compuestos sobre la expresión de proteínas regulatorias del ciclo celular fue examinado. Células cancerosas de mama y próstata fueron tratadas en la ausencia y presencia de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa (**60, 64, 76, 68 y 70**) y con uno que no causó cambio en el crecimiento celular (**63**).

Para el análisis de la expresión de genes, las células fueron incubadas en presencia de SAHA, los compuestos sintetizados **57 a 76** a la concentración de 10 μM, o el vehículo (DMSO) durante 24 hrs. El RNA se extrajo con el reactivo de Trizol y fue sometido a transcripción en reversa usando un sistema de transcripción RT. La PCR en tiempo real fue llevada a cabo en el

⁴⁴ Natarajan, U.; Venkatesan, T.; Radhakrishnan, V.; Samuel, S.; Rasappan, P.; Rathinavelu, A. Medicina (Kaunas). **2019**, 55 (2), 30-45.

LightCycler 2.0 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), siguiendo el protocolo: Se activó la Taq DNA polimerasa y se desnaturalizó el DNA a 95 °C por 10 min, se procedió por 45 amplificaciones consistiendo en 10 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, y 1 s a 72 °C. Se usaron los siguientes oligonucleótidos se usaron: ciclina D1 (CCND1) CCND1-F, GAAGATCGTCGCCACCTG; CCND1-R, GACCTCCTCCTCGCACTTCT; p21-F, TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC; p21-R, GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA; p53-F, GTCCCAAGCAATGGATGATT; p53-R, TCTGGACCTGGGTCTTCAGT; GAPDH-F, AGCCACATCGCTGAGACAC; GAPDH-R, GCCCAATACGACCAAATCC fue usado como control interno.

Como se describe en la Tabla 13, en las líneas celulares BT-474 y PC3 se observó que el SAHA y la mayoría de los compuestos incrementan significativamente la expresión génica de p21 y disminuyen la de p53 y los niveles de CD1 en mRNA cuando se comparan con el vehículo. Estos efectos no se observaron cuando las células fueron expuestas al compuesto **68**. Como se esperaba, la expresión génica de p21 y CD1 no se ve afectada por **63**. De cualquier forma, los niveles de mRNA para p53 fueron significativamente disminuidos cuando las células fueron tratadas con este compuesto.

Tabla 13. Efecto de los compuestos en la expresión de genes relacionados con la apoptosis e interrupción del ciclo celular.

BT-474			
Compuesto	p21	p53	CD1
SAHA	17.39±3.70*	0.12±0.08*	0.02±0.00*
60	3.81±1.08*	0.57±0.27*	0.51±0.09*
63	1.47±0.41	0.47±0.08*	0.92±0.06
64	5.47±2.01*	0.08±0.00*	0.57±0.07*
76	23.65±6.69*	0.51±0.22*	0.40±0.36
68	0.44±0.02*	0.74±0.21	0.91±0.05
70	26.56±0.44*	0.57±0.24*	0.32±0.09*
PC3			
Compuesto	p21	p53	CD1
SAHA	7.44±2.24*	0.12±0.14*	0.04±0.01*
60	3.48±0.55*	0.25±0.17*	0.61±0.13
63	1.41±0.27	0.49±0.23*	0.64±0.19
64	3.90±0.43*	0.18±0.11*	0.30±0.02*
76	3.60±0.78*	0.16±0.20*	0.32±0.22*
68	2.07±0.66	0.42±0.39	0.90±0.30
70	3.80±2.33	0.16±0.06*	0.43±0.27*

Las células BT-474 y PC3 fueron incubadas en ausencia y presencia de SAHA (10⁻³ M), o de los compuestos por 24 h. Subsecuentemente, el mRNA se extrajo y se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real (qPCR). Los resultados muestran la media (± S.D.) de los genes/GAPDH mRNA normalizada respecto a la determinación por triplicado y representa al menos dos diferentes experimentos. Las células tratadas con el vehículo recibieron arbitrariamente un valor de 1. *p<0.05 vs. vehículo.

- PCR en tiempo real (RT-PCR).

En general, la actividad antiproliferativa de los compuestos correlaciona bien con la regulación de genes en las dos líneas celulares de cáncer. A pesar de eso, el compuesto **68** mostró efectos de inhibición del crecimiento celular comparables a los de SAHA a la concentración de 10 μM (Tabla 12), este análogo no cambió la expresión de los genes regulatorios del ciclo celular. Posiblemente, la combinación de un espaciador de 5 átomos de carbono unido a una cumarina con sustituyente de Br en la estructura de la molécula puede afectar su localización en el núcleo y así no modular la expresión de genes regulatorios, pero conserva la actividad contra HDACs localizadas en el citoplasma o membrana plasmática como HDAC3. Al incrementar significativamente la expresión génica de p21, la p53 impide la proliferación celular. Esta interrupción le da la oportunidad a la célula de crear reparaciones, si es posible. Es decir, los compuestos podrían actuar en la fase temprana G1 del ciclo celular, permitiendo una pronta reparación del genoma⁴⁵.

- Microscopía de fluorescencia y cuantificación espectrofluorométrica.

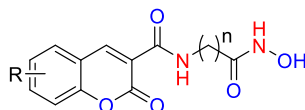
Para completar la caracterización de las estructuras de cumarina, se realizó un análisis de absorción ultravioleta y de emisión de fluorescencia usando diferentes concentraciones de los compuestos en distintos disolventes, las longitudes de máxima absorción y emisión se muestran en la Tabla 14.

Para realizar la cuantificación relativa de fluorescencia, las células se hicieron crecer en placas de 96 pozos especiales para poder medir la fluorescencia (Corning Costar, Modelo 3904 assay plate; Corning, NY, USA) y recibieron el mismo tratamiento previamente descrito. Las células fueron lavadas con un buffer salino de fosfatos e incubadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) libre de suero, sin rojo de fenol. La fluorescencia fue leída en un lector Biotek Synergy HT (a 420 nm de excitación, y 485 nm de emisión).

Para la microscopía confocal, las células se hicieron crecer en cámaras Lab-Tek II a una densidad de 1×10^5 células/cámara. Posteriormente, se adicionaron 10 μM de los análogos (**70** y **72**) o SAHA, y se mantuvieron así durante un periodo de 48 h. Después de dos lavados con solución salina balanceada de Hanks (HBSS), las células fueron fijadas con MeOH/H₂O (80:20 v/v) durante 30 min a 4 °C, seguido de dos lavados con HBSS. Para realizar tinción selectiva de núcleo, las células se incubaron por 1 h a temperatura ambiente en una solución de yoduro de propidio (PI) (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y resuspendidas con HBSS. Las cámaras fueron removidas y los cubreobjetos se pegaron a un portaobjetos usando el medio de fijación VECTASHIEL. Las imágenes se tomaron en un microscopio Olympus FV1000, con un objetivo a 40X, usando como longitud de excitación 536 nm y como longitud de emisión 617 nm para la fluorescencia de PI, con 420 nm y 485 nm para la fluorescencia de los análogos.

⁴⁵ Pei-Chang, S.; Ching, T.; Ban-Hen, C.; Chen-Wei, L.; Cheng-Ping, Y.; Jong-Shiaw, J. *J Biomed Sci.* **2010**, *17* (1), 76-85.

Tabla 14. Longitudes de absorción y emisión correspondientes a los compuestos **57-72**.



Compuesto	R	n	$\lambda_{ab}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$
57	H	1	297	406
58		2	303	405
60		5	329	405
63	6-MeO-	3	363	458
64		5	365	458
76	8-EtO-	5	311	486
65	6-Br-	1	294	424
66		2	295	415
68		5	283	424
70	7-Et ₂ N-	2	419	470
72		5	419	470

En la Figura 18, se hace el correspondiente traslape de los espectros de absorción y emisión para el compuesto **70**, se puede observar que el desplazamiento de Stokes es de 50 nm, lo cual nos daría pie a pensar que podría haber autoextinción, cosa que no se observa en los experimentos, la principal razón por la cual no ocurre es que no existe un traslape importante entre ambos espectros. Lo que evita que los fotones emitidos no sean captados por otra molécula sin excitar.

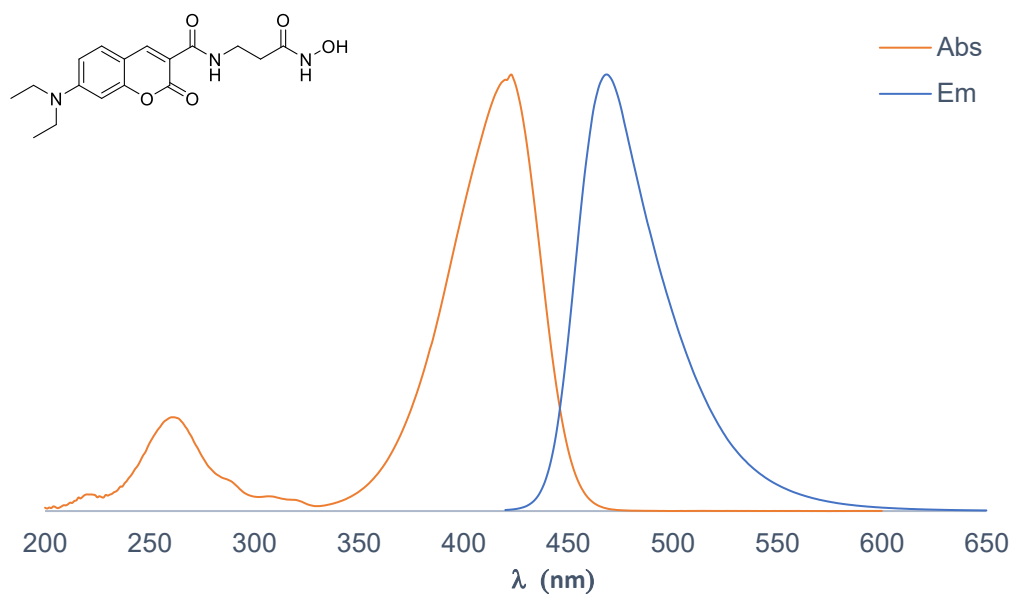


Figura 18. Gráfica de espectros de máxima Absorción (Abs.) y Emisión para la molécula **70**, en MeOH 10^{-6} M.

Considerando las propiedades fluorescentes de las cumarinas, la excitabilidad y la localización subcelular de los análogos de SAHA fueron analizadas. Para ello, se incubaron las líneas celulares de BT-471, PC3 y MDA-MB-231 en presencia de los diferentes compuestos durante un periodo de 72-144 h; de esta forma se adquirió la fluorescencia relativa emitida. El SAHA fue utilizado como un control negativo de fluorescencia. De los 11 compuestos evaluados, solamente **70** y **72** incrementaron significativamente la fluorescencia relativa cuando se les compararon con las células tratadas con DMSO. Como nota, el compuesto **70** mostró significativamente un incremento en la emisión de la fluorescencia a 0.01 μM en las células MDA-MB-231 (Figura 19B). En seguida, para tratar de visualizar la penetración y la localización subcelular de los compuestos **70** y **72**, se obtuvieron imágenes por microscopía de fluorescencia de las tres líneas celulares. La adición de los compuestos a una concentración de 10 μM mostró incremento significativo de la fluorescencia, lo que indicó que hubo permeación y absorción en la célula. Este efecto fue principalmente observado con el compuesto **70** (Figura 19).

El mismo compuesto, mostró localización intracelular citoplasmática y una co-localización con el yoduro de propidio (PI) indicando que el compuesto se localizó en el núcleo, esto como se puede observar con el cambio de coloración del núcleo de rojo a rosa mexicano en las imágenes de subreposición de la fluorescencia del compuesto y del núcleo (*merge*) principalmente en las células BT-474 (Figura 19A). Resultados similares se obtienen en las células MDA-MD-231 y PC3, pero con menor intensidad de fluorescencia (Figura 19B y 19C). El compuesto **72**, se observa únicamente en el citoplasma, sugiriendo que este compuesto no penetra al núcleo, en ninguna de las líneas celulares. Estos resultados sugieren que la falta de actividad antiproliferativa del compuesto **72** (Tabla 12) puede ser debida a la falta de penetración al núcleo y menor absorción celular.

Considerando las propiedades fluorescentes y la actividad antiproliferativa del compuesto **70**, este compuesto se convierte en una molécula de gran interés para futuros estudios sobre el mecanismo de acción de los inhibidores de HDACs.

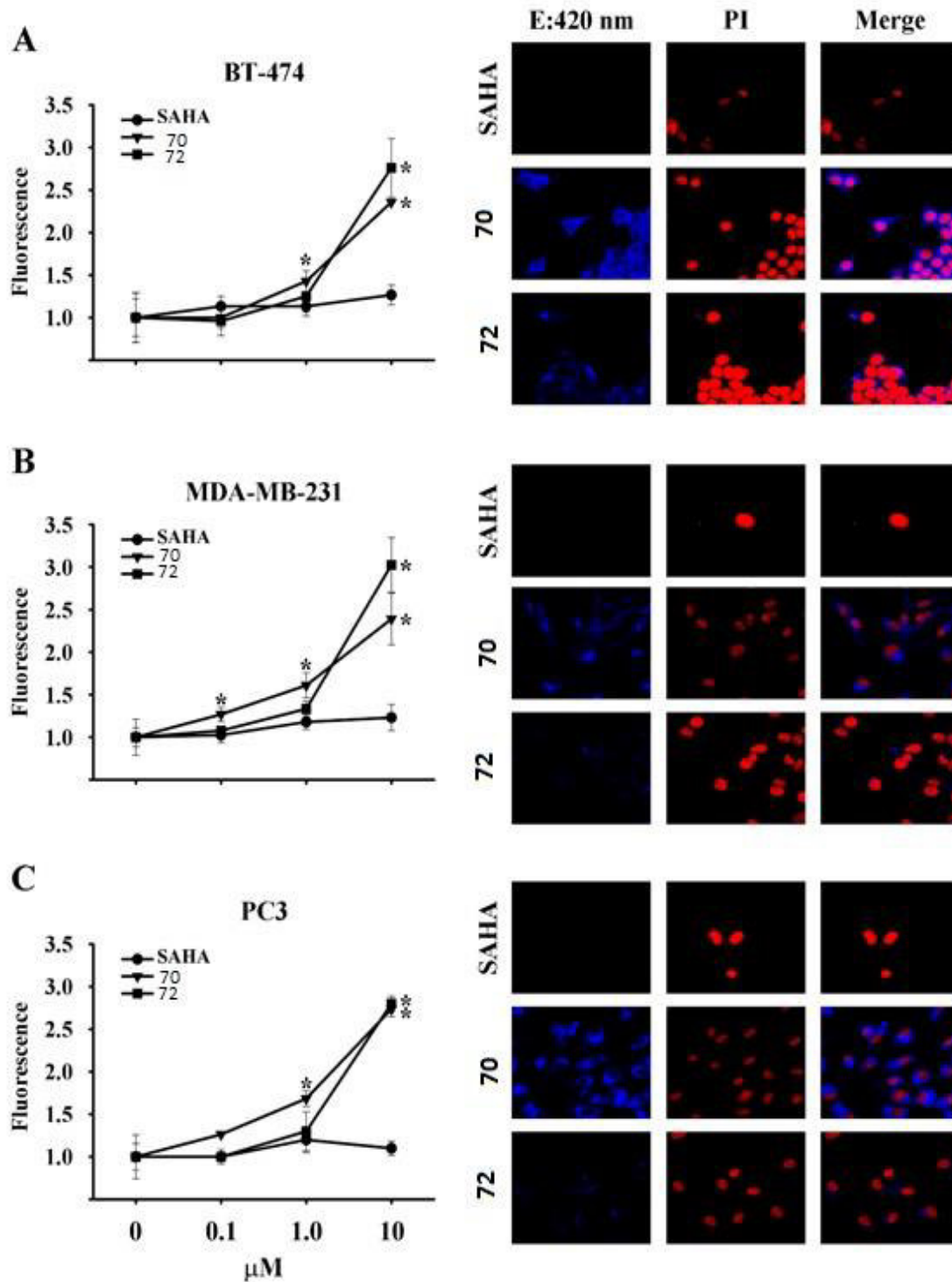


Figura 19. Intensidad relativa de la emisión de fluorescencia, y localización subcelular de los compuestos **70** y **72**. A la izquierda, las células se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos y se realizó una cuantificación espectrofluorométrica. Los resultados están expresados como la media \pm S.D. de tres experimentos diferentes. Los datos obtenidos de las células tratadas con vehículo se establecieron como uno. * $P < 0.05$ vs vehículo.

1.6.4 DOCKING DIRIGIDO

Se ha reportado que la sobreexpresión de HDAC1 en BT-474⁴⁶ y en PC3⁴⁷ es lo que promueve el desarrollo de cáncer; por otro lado, HDAC6 y HDAC8 juegan un papel crítico en las células MDA-MB-231⁴⁸. Por esta razón, se seleccionaron a dichas isoformas como blancos para realizarles estudios de *docking*. Para poder obtener una mejor comprensión del modo de unión, se seleccionaron cinco compuestos: **60**, **64**, **76**, **68**, y **70** los cuales fueron estudiados frente al sitio activo de HDAC1, HDAC6 y HDAC8.

Respecto a los modos de unión para HDAC1, todos fueron comparados con el SAHA. Los cuatro compuestos **60**, **64**, **76** y **68** mostraron una gran similitud con los modos de unión de SAHA, el grupo hidroxámico se posiciona dentro del sitio activo y se coordina con el átomo de Zn; por su parte el compuesto **70** presentó una geometría monodentada, a diferencia de los demás (incluido SAHA) que muestran una coordinación bidentada. Respecto a la cumarina, en todos los ligandos, esta sigue convirtiéndose en el grupo “tapón” del sitio activo, para **60** y **70**, la cumarina se posiciona de tal forma que el grupo carbonilo forma puente de hidrógeno con la enzima, mientras que para **64**, **76** y **68** dicho grupo se posiciona en sentido opuesto a la superficie de la enzima (Figura 20).

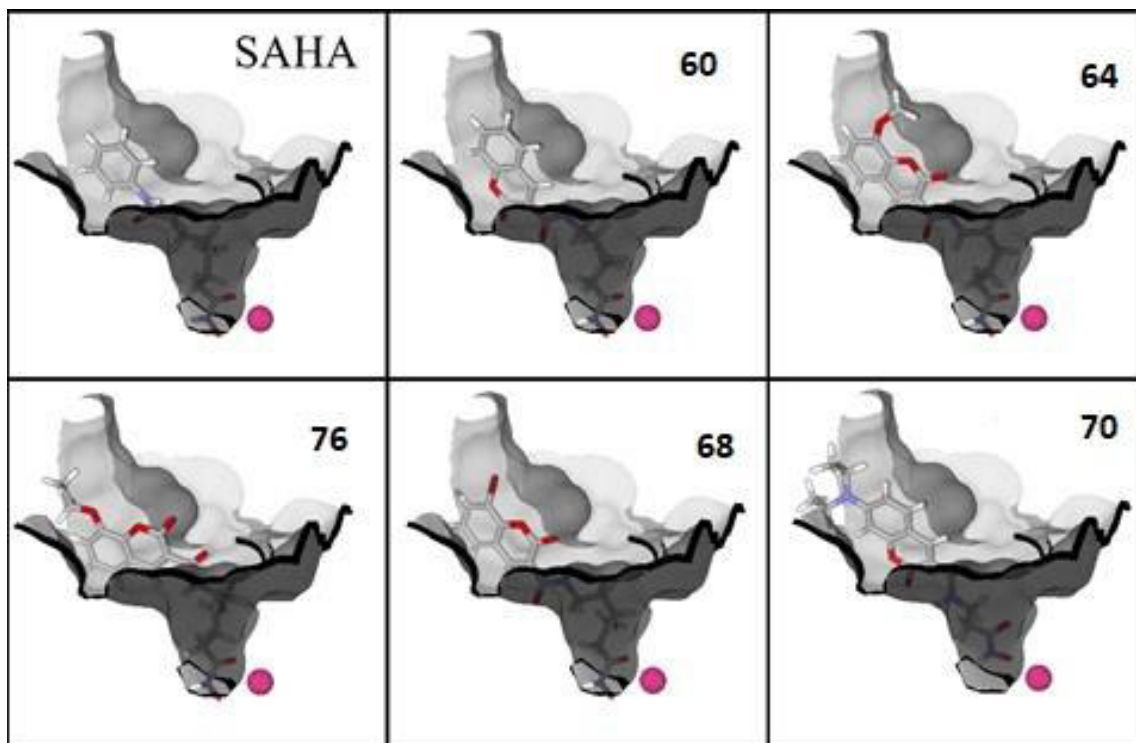


Figura 20. Interacciones calculadas por el proceso *docking* para SAHA y los ligantes **60**, **64**, **76**, **68** y **70** en el sitio activo de HDAC1. Los ligandos se muestran en modelo de tubos, los átomos

⁴⁶ Greer, C. B.; Tanaka, Y.; Kim, Y. J.; Xie, P.; Zhang, M. Q.; Park, I.-H.; Kim, T. H. *Cell Rep.*, **2015**, *13*, 1444-1455.

⁴⁷ Kim, N. H.; Kim, S.-N.; Kim, Y. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2011**, *404*, 915-921.

⁴⁸ Park, S. Y.; Jun, J. A.; Jeong, K. J.; Heo, H. J.; Sohn, J. S.; Lee, H. Y.; Park, C. G.; Kang, J. *Oncol. Rep.*, **2011**, *25*, 1677-1681.

de oxígeno en rojo, el bromo en color rojo oscuro, los átomos de carbono en gris, átomos de nitrógeno en morado y el Zn se presenta en color rosa.

Los cinco compuestos (**60**, **64**, **76**, **68**, **70**) y también el SAHA, fueron evaluados en el sitio activo de HDAC6. Los resultados muestran que existe potencial interacción tipo apilamiento-T entre el anillo aromático de la fenilalanina y el anillo de la cumarina, esto para todos los ligandos, incluido el SAHA con su respectivo fenilo, en una distancia de alrededor de 5.5 Å. Cuatro de estas estructuras presentaron una coordinación bidentada con el átomo de Zn, solamente **70** presentó una coordinación monodentada. Por último, todos los compuestos mostraron una conformación en la cual la cumarina orienta su grupo carbonilo prácticamente en el mismo lugar y misma dirección (Figura 21).

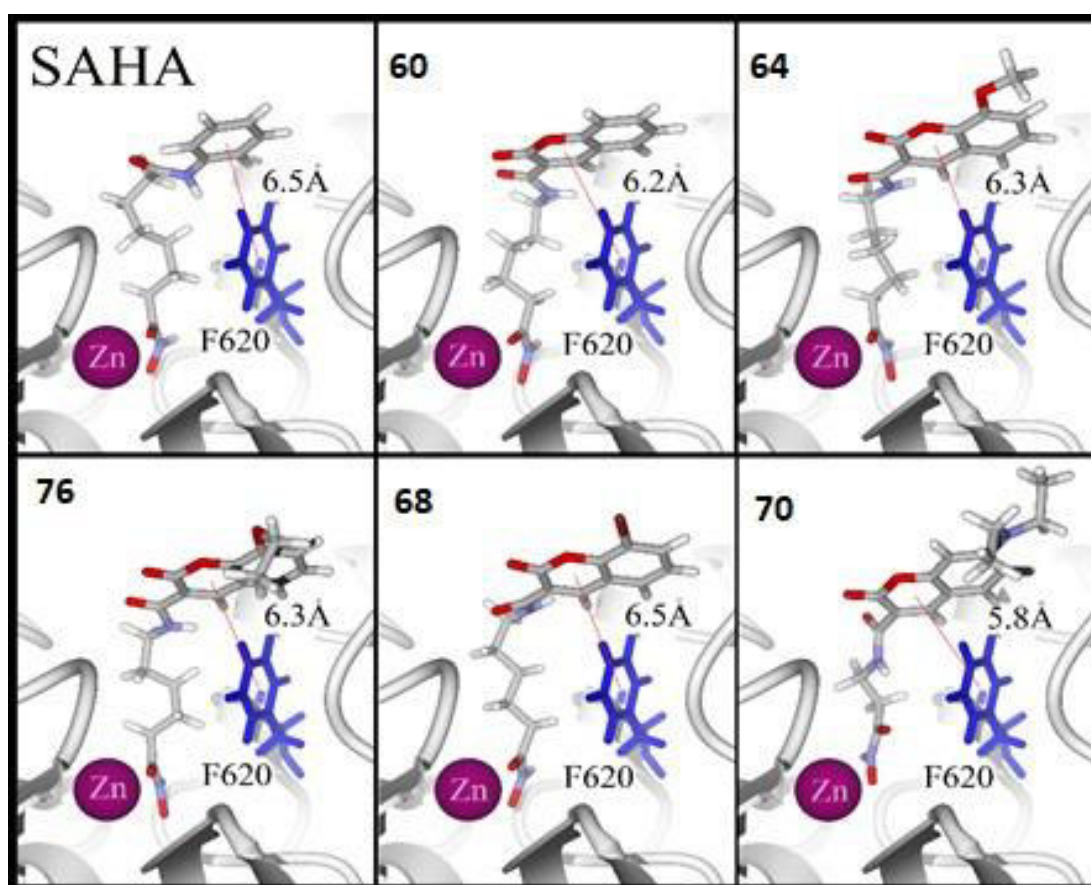


Figura 21. Potencial interacción de apilamiento-T entre los compuestos seleccionados y el residuo de fenilalanina en el sitio activo de HDAC6.

Por otro lado, los compuestos (**60**, **64**, **76**, **68**, **70**) así como el SAHA, también fueron evaluados en el sitio activo de HDAC8. Los resultados muestran que todos (excepto **70**), presentan un modo de unión similar a SAHA, la similitud es una coordinación entre el grupo hidroxámico y el átomo de Zn. Dos moléculas, **60** y **68**, presentan la mayor cantidad y fuerza como aceptores de puentes de hidrógeno con histidina y tirosina en el fondo del sitio activo. También, **60**, **64** y **76** presentan carácter aceptor de hidrógeno con la lisina del sitio activo; para **64** y **76**, se presentó un aceptor

de hidrógeno extra, con el residuo de tirosina. Además, el halógeno de **68** promovió la orientación opuesta del anillo de cumarina, evitando así las interacciones de hidrógeno con la lisina, y **70** mostró dos interacciones de este tipo con tirosina y dos más con la lisina además de una con histidina, pero mostró una coordinación monodentada con el átomo de Zinc (Figura 22).

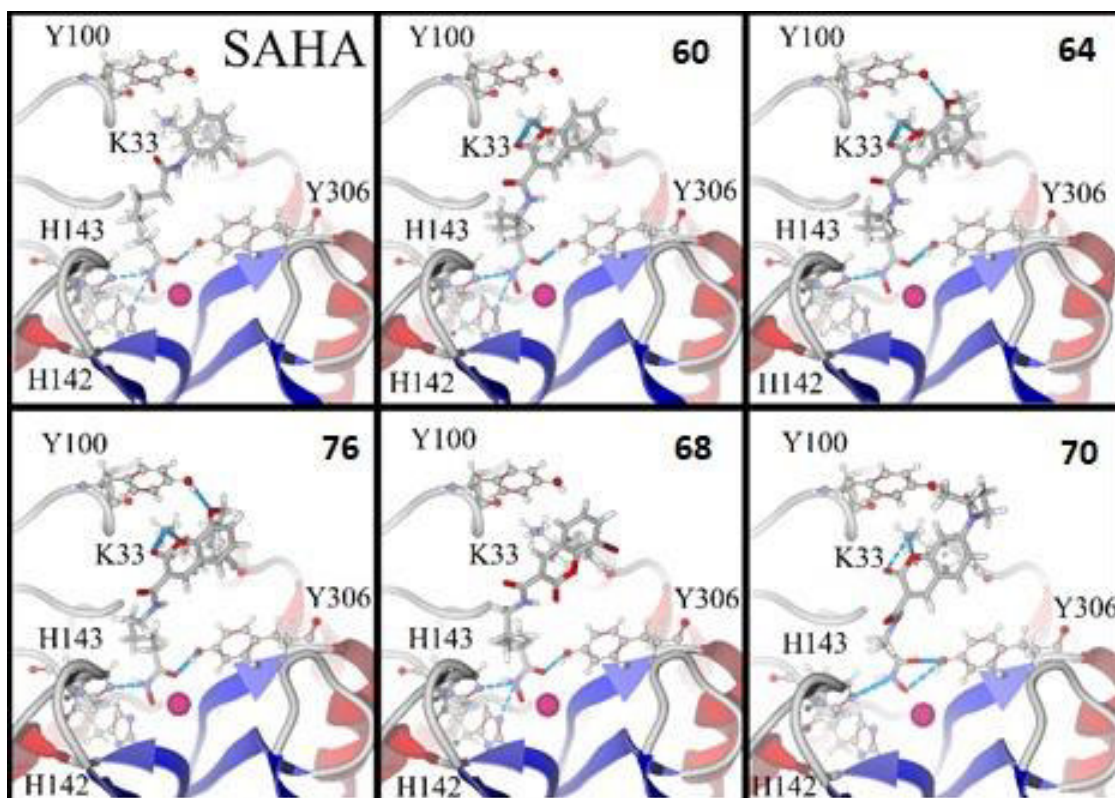


Figura 22. Interacciones de puente de hidrógeno del SAHA y las moléculas con el sitio activo de HDAC8.

Las propiedades de enlace del compuesto **76** concuerdan con la elevada actividad mostrada en su evaluación biológica; la combinación de las interacciones de apilamiento, la coordinación bidentada con el átomo de zinc, y el gran número de interacciones de puente de hidrógeno, son las propiedades deseables de un inhibidor de HDAC, todas fueron mostradas en la evaluación *docking* de este compuesto.

1.7 CONCLUSIONES

Una nueva familia de derivados de cumarina funcionalizados con ácidos hidroxámicos fue sintetizada. Los compuestos evaluados se sintetizaron en rendimientos moderados (30-87%) a través de una metodología simple, observando bandas de absorción máxima de 298-422 nm y emisiones de 405-470 nm. La evaluación biológica se llevó a cabo en una línea de próstata (PC3) y dos de cáncer de mama (BT-474 y MDA-MB-231) para determinar los efectos de los derivados de cumarina sobre la proliferación celular y la expresión génica. La inhibición de la proliferación de células cancerosas por los compuestos **60**, **64**, **76**, **68** y **70** (a 10 μ M) fue similar a la encontrada con el compuesto de referencia (SAHA) a una concentración comparable. En la mayoría de los casos, la actividad antiproliferativa estuvo acompañada por el incremento de los niveles de la expresión génica del inhibidor de la quinasa p21 dependiente de ciclina, y por la regulación negativa del gen supresor de tumores p53 y la regulación de la expresión del gen de ciclina D1. Los estudios de acoplamiento molecular realizados para los compuestos **60**, **64**, **76**, **68** y **70** en HDAC1, HDAC6 y HDAC8 mostraron una fuerte unión a los sitios activos respectivos. Los compuestos **70** y **72** poseen fluorescencia encontrando el primero en el núcleo celular.

Los compuestos **60**, **64**, **76**, **68** y **70** pueden considerarse agentes anticancerosos potenciales, debido a sus propiedades antiproliferativas, su efecto sobre la regulación de los genes p21, p53 y ciclina D1, así como su capacidad para acoplarse al sitio activo de HDAC1, HDAC6 y HDAC8. Sin embargo, se necesitan investigaciones futuras para analizar directamente la inhibición de la actividad enzimática de HDAC por estos compuestos. Por otro lado, con base a las propiedades fluorescentes del compuesto **70**, en un futuro podría proporcionar más información con respecto a su actividad antiproliferativa y ser utilizado en estudios sobre el mecanismo de acción de los inhibidores de HDACs.

CAPITULO II

AGENTES ANTIFÚNGICOS

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Cumarinas y Antifúngicos

Las infecciones fúngicas invasivas se han vuelto alarmantes recientemente debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes que recibieron trasplante de células madre, quimioterapia antineoplásica, trasplante de órganos o sufrieron una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)⁴⁹. Muchas infecciones fúngicas son causadas por patógenos oportunistas de *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*⁵⁰.

Los agentes antifúngicos representativos utilizados en la terapia clínica incluyen triazoles (fluconazol, voriconazol, itraconazol y posaconazol), polienos (anfotericina B, nistatina), inhibidores de la síntesis de glucano por ejemplo: echinocandinas, caspofungina, micafungina e inhibidores de la síntesis de quitina y flucitosina (por ejemplo: polioxinas), pero cada una de estas terapias presenta cierta limitación⁵¹. Es a causa de estas que exista una demanda continua por la investigación de nuevos agentes antifúngicos para tratar las infecciones por hongos

La cumarina y sus derivados ocupan una posición importante en la química médica, pues tienen una capacidad latente para ejercer interacciones no covalentes (π - π , hidrófobas, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, coordinación de metales y fuerzas de Van der Waals, etc.) con los diversos sitios activos en los organismos⁵². Como medicamentos, muchos de ellos muestran una amplia gama de bioactividades (antibacterianos, antifúngicos, anticoagulantes, etc.). Por lo tanto, la naturaleza biológica diversa de los derivados de cumarina ha hecho que se convierta en una estructura privilegiada en química medicinal y se ha prestado mucha atención a la síntesis de numerosos derivados de cumarina sustituidos⁵³.

En los últimos años, la estrategia de hibridación molecular ha surgido como un nuevo enfoque que involucra la conglomeración de dos o más farmacóforos en un andamio molecular para desarrollar moléculas multifuncionales híbridas, causándoles un perfil de selectividad modificado, modos de acción diferentes o duales y/o efectos secundarios no deseados reducidos debido a la mezcla de los farmacóforos en una sola molécula. Usando este enfoque, varios grupos de investigación han diseñado y sintetizado muchas moléculas híbridas⁵⁴. Siendo las cumarinas estructuras privilegiadas que se encuentran ampliamente distribuidas como productos naturales, o de síntesis con una gran variedad de aplicaciones, que han despertado un gran interés en los últimos años para su desarrollo y funcionalización⁵⁵. Además, sigue creciendo el interés de

⁴⁹ Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 133-163.

⁵⁰ Seyedmousavi, S.; Verweij, P.E.; Mouton, J.W. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2015**, *13*, 9-27.

⁵¹ Kathiravan, M.K.; Salake, A.B.; Chothe, A.S.; Dudhe, P.B.; Watode, R.P.; Mukta, M.S.; Gadhwane, S. *Bioorg Med. Chem.* **2012**, *20*, 5678-5698.

⁵² Peng, X.M.; Damu, G.L.; Zhou, C. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 3884-3930.

⁵³ Ji, Q.; Ge, Z.; Ge, Z.; Chen, K.; Wu, H.; Liu, X.; Huang, Y.; Yuan, L.; Yang, X.; Liao, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *108*, 166-176.

⁵⁴ Sandhu, S.; Bansal, Y.; Silakari, O.; Bansal, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3806-3814.

⁵⁵ Kraljevic, T.G.; Harej, A.; Sedić, M.; Pavelić, S.K.; Stepanić, V.; Drenjančević, D.; Talapko, J.; Raić-Malić, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 794-808.

desarrollar diversas metodologías de síntesis que otorguen tanto buenos rendimientos, tolerancia a grupos funcionales, y una variedad de patrones de sustitución.

La hibridación o el acoplamiento de diferentes derivados de cumarina con variadas moléculas bioactivas como el resveratrol, maleimida sulfonamidas, pirazolina, chalcona, triazoles y ácido lipóico han producido nuevas moléculas híbridas, que están dotadas de propiedades vaso relajantes, antiagregantes de plaquetas, anticancerígenas, antimicrobianos; o propiedades antioxidantes y antiinflamatorias⁵⁶.

Por lo tanto, el enfoque de hibridación molecular está jugando un papel importante en el desarrollo de nuevas moléculas para el tratamiento de numerosas enfermedades multifactoriales. Así, la hibridación del núcleo de cumarina con otros restos ha proporcionado nuevas moléculas con perfiles interesantes de actividad biológica antifúngica (Figura 23).

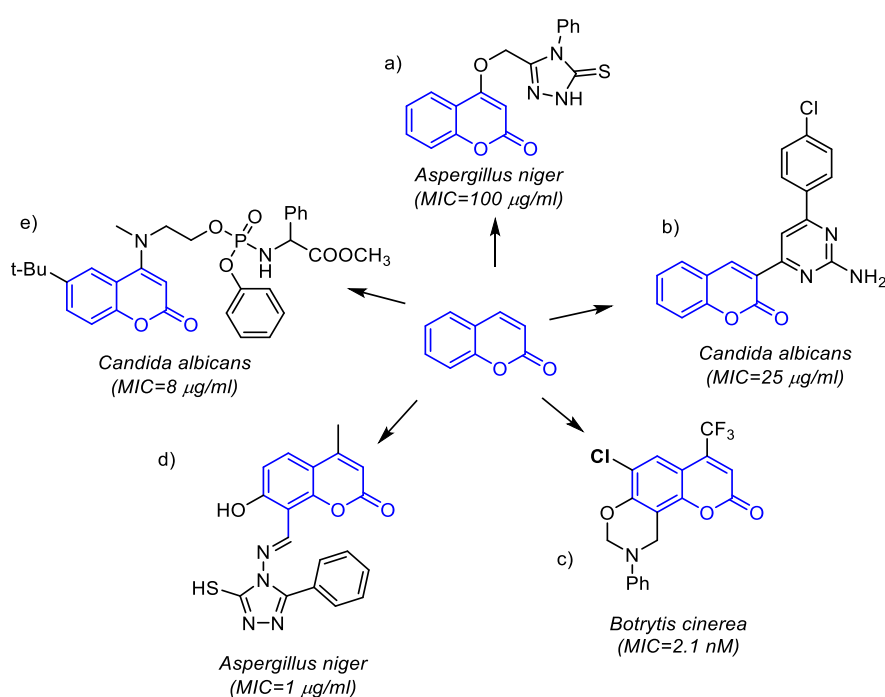


Figura 23. Derivados de cumarina con propiedad antifúngica frente a distintos hongos⁵⁷.

2.1.2 Triazoles

En años recientes el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas ha incrementado comúnmente en pacientes inmunocomprometidos que padecen cáncer, SIDA, e inclusive en pacientes con trasplantes de órganos⁵⁸. La candidiasis, aspergilosis, y criptococosis, son los tres

⁵⁶ Vilar, S.; Quezada, E.; Santana, L.; Uriarte, E.; Yáñez, M.; Fraiz, N.; Alcaide, C.; Cano, E.; Orallo, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 257-261.

⁵⁷ a) Al-Ameirey, A.A.; Hassan Kadhun, A. A.; Mohamad, A.B. *Molecules*. **2012**, *17*, 5713-5723.; b) Imran, M.; Ahmad Khan, S. *Trop. J. Pharm. Res.* **2015**, *14*, 1265-1272.; c) Zhang, M. Z.; Zhang, R.R.; Yin, W.Z.; Yu, X.; Zhang, Y.-L.; Liu, P.; Gu, Y.-C.; Zhang, W.-H. *Mol. Divers.* **2016**, *20*, 611-618.; d) Kalwania, G.S.; Bajroliya, S. *Asian J. Chem.* **2015**, *27*, 3956-3960.; e) Ji, Q.; Ge, Z.; Ge, Z.; Chen, K.; Wu, H.; Liu, X.; Huang, Y.; Yuan, L.; Yang, X.; Liao, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *108*, 166-176.

⁵⁸ Wingard, J.R.; Leather, H. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2004**, *10*, 73-90.

tipos principales de infecciones presentes en personas inmunocomprometidas⁵⁹. De todos los tipos de fármacos disponibles contra estas infecciones, los azoles han probado ser los más efectivos (fluconazol, voriconazol, e itraconazol).

Los anillos de 1*H*-1,2,4-triazol presentan una variedad de efectos farmacológicos como: antiinflamatorios⁶⁰, antivirales, antimicrobiales, antitumorales, anticonvulsivos, analgésicos, antiparasitarios, fungicidas, insecticidas, herbicidas, y hasta reguladores del crecimiento de las plantas⁶¹ (Figura 24). Poseen especial interés debido a sus excelentes características farmacocinéticas y perfiles de seguridad favorables, así como también por su latente habilidad de formar puentes de hidrógeno con otras moléculas activas⁶².

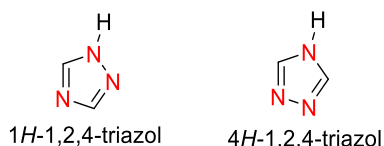


Figura 24. Isómeros estructurales de triazol.

El fluconazol, un 1,2,4-triazol, ha demostrado un rendimiento terapéutico excepcional contra las infecciones por *Candida*. Es un fármaco de elección para el tratamiento de infecciones por *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* debido a su potente actividad, excelente perfil de seguridad y características farmacocinéticas favorables. Sin embargo, el uso extensivo del fluconazol ha aumentado el número de aislamientos de *C. albicans* resistentes al mismo; además este compuesto no es eficaz contra la aspergilosis invasiva⁶³, y ha sufrido una fuerte resistencia a los medicamentos. Esta situación resalta la necesidad de nuevos derivados de triazol que posean espectros antifúngicos más amplios e índices terapéuticos más altos. Basados en esta información, existen diferentes compuestos análogos de fluconazol en la literatura (Figura 25). Por su parte, los 1,2,3-triazoles son estables a degradación metabólica y son capaces de formar puentes de hidrógeno, lo cual puede favorecer el enlace con objetivos biomoleculares y su solubilidad⁶⁴. No están presentes en la naturaleza, pero las moléculas sintetizadas con el anillo presentan diversas actividades biológicas, como: antibacteriales, herbicidas, fungicidas, antialérgicas, y anti-VIH⁶⁵ (Figura 26).

⁵⁹ Steenbergen, J.N.; Casadevall, A. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*,1974-1976.

⁶⁰ Tozkoparan, B.; ökhan, N.; Aktay, G.; Yeşilada, E.; Ertan, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *34*, 743-750.

⁶¹ Moreno-Manas, M.; Arredondo, Y.; Pleixats, R.; Teixidó M.; Raga, M. M.; Palacín C.; Castelló, J. M.; Ortiz, J. A. *J. Hetero. Chem.* **1992**, *29*, 1557-1560.

⁶² Shichong, Y.; Chai, X.; Hu, H.; Yan, Y.; Guan, Z.; Zou, Y.; Sun, Q.; Wu, Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4435-4445.

⁶³ Pore, V. S.; Agalave, S. G.; Singh, P.; Shukla, P. K. Kumarc, V.; Siddiqic, M. I. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 6551–6561.

⁶⁴ Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, D.; Ghadir, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366-15367.

⁶⁵ Genin, M. J.; Allwine, D.A.; Anderson, D.J.; Barbachyn, M. R.; Emmert, D.E.; Stuart, A.; Garmon, D. R.; Graber, K. C.; Grega, J. B.; Hester D.K.; Hutchinson, J.; Morris, R.J.; Reischer, C. W.; Ford, G. E.; Zurenko, J. C.; Hamel, R. D.; Schaadt, D.; Stapert, B.; Yagi, H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 953-970.

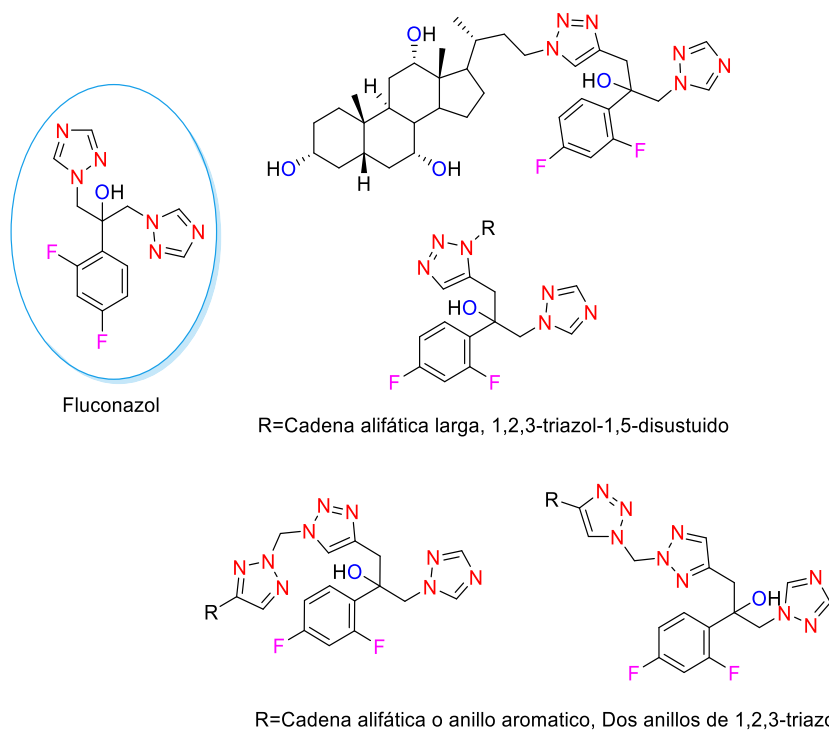


Figura 25. Algunos de los análogos de fluconazol reportados.

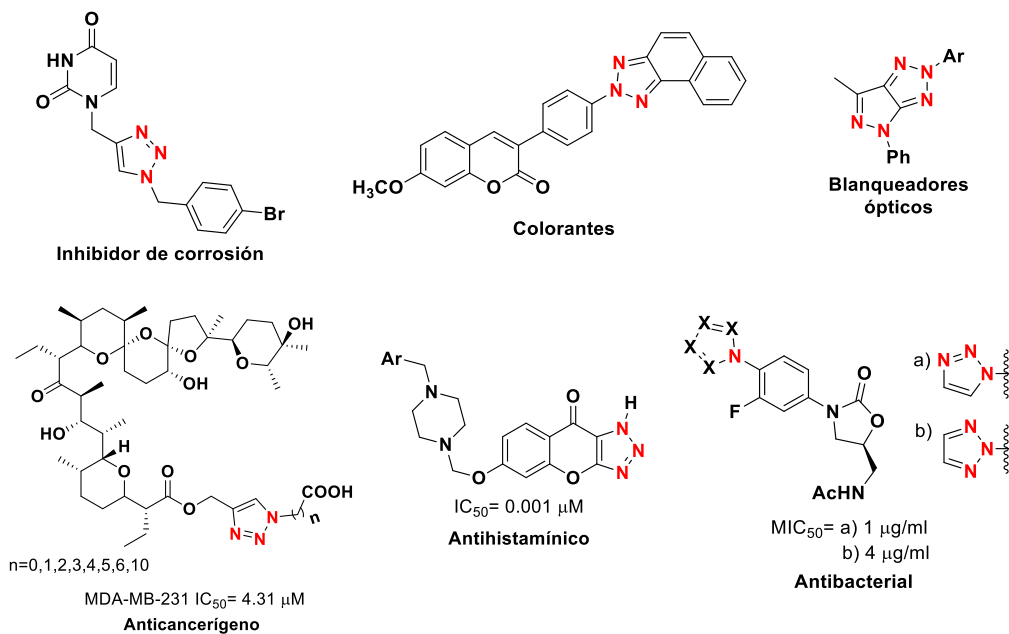


Figura 26. Presencia de 1,2,3-triazoles en distintas moléculas bioactivas.

Por último, la constante aplicación de estos antifúngicos ha resultado en el desarrollo de resistencia por parte de los hongos, así mismo, existen los casos de algunos agentes que

permanecen limitados por su pobre actividad frente a ciertas cepas, por presentar una toxicidad renal alta y otros efectos adversos severos⁶⁶.

Estas situaciones y el surgimiento de resistencia muestran la necesidad de desarrollar nuevos agentes antifúngicos con amplio espectro, baja toxicidad y altos índices terapéuticos.

Previamente, se realizó con ayuda del grupo de investigación en química teórica y computacional de la Universidad de Guanajuato un estudio teórico computacional sobre una isoenzima de CYP51 aislada de *Mycobacterium tuberculosis*, tratando de acoplar varios derivados de cumarina funcionalizados con anillos de triazol⁶⁷, la cuestión principal con ese estudio fue que las moléculas propuestas no lograban entrar en el sitio activo de la enzima quedándose en la entrada del canal (Figura 27); para resolver ese problema se fueron modificando las estructuras hasta quedar en derivados sencillos, cuya sencillez permitió una rápida síntesis y aplicación sobre diferentes cepas de *Candida*. En un principio se pensó que ninguna estructura debería contener dos anillos de triazol, pero en la literatura existen reportes sobre moléculas aún más grandes tanto en número de átomos como en tamaño (Å), lo que cambia es el sitio activo sobre el cual actúan; en conclusión, se encontró que dependiendo de la estructura del sitio activo, las moléculas de cumarina y dos triazoles podrían tener actividad, así que se continuó con la propuesta de una ruta de síntesis para análogos de fluconazol con base de cumarina.

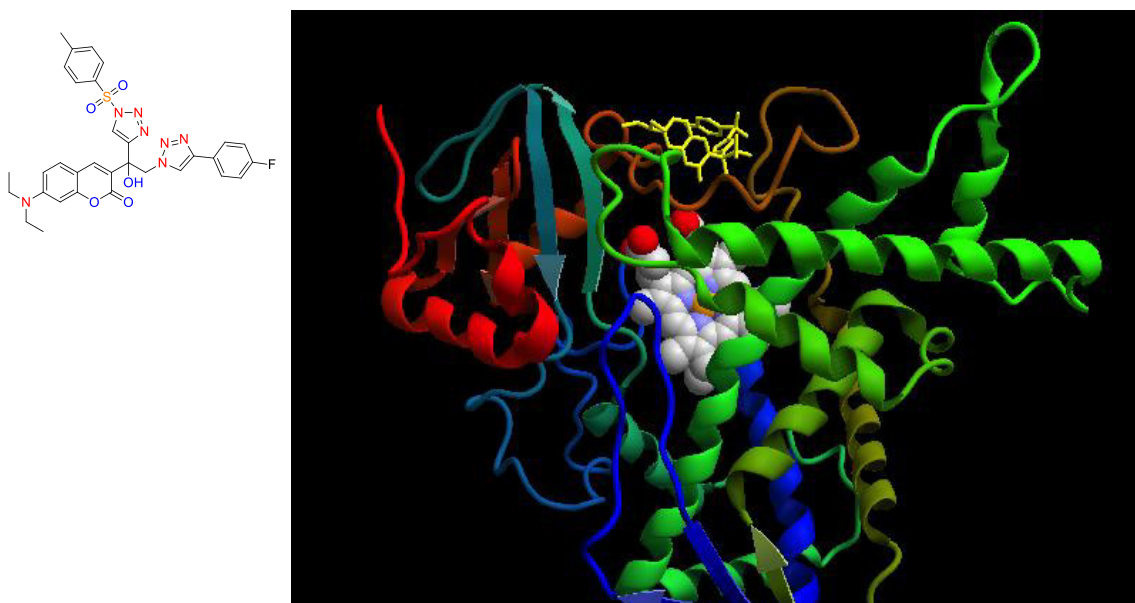


Figura 27. Máxima aproximación al sitio activo calculada para las moléculas propuestas.

⁶⁶ Yuan, S.; Zhou, C. H. *Bioorg. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 956-960.

⁶⁷ Villaseñor-Granados, T.; García, S.; Vazquez, M.A.; Robles, J. *Theor. Chem. Acc.* **2016**, *135*, 1-16.

2.1.3 Cándidas

En los últimos 30 años se ha presentado incremento significativo en la incidencia de infecciones fúngicas en pacientes con enfermedades infecciosas o inclusive con trasplantes de órgano⁶⁸ ; dichas infecciones pueden ser desde superficiales o sistémicas. De los patógenos humanos más comunes, los miembros del género *Candida* son los más frecuentes, conteniendo alrededor de 150 especies⁶⁹, se sabe que el 65% no pueden ser patógenos en humanos debido a sus requerimientos térmicos de crecimiento (una temperatura mayor de 37 °C). De las especies patogénicas, *Candida albicans* es la que tiene mayor prevalencia⁷⁰, representando un 80% de las candidiasis, cabe mencionar que esto ha venido cambiando desde hace un par de décadas, se ha encontrado un incremento en infecciones por especies de *Candida no albicans* (NCAC, non-*C. albicans Candida*)⁷¹, resultando que después de *albicans*, especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis* son las tres más frecuentes causantes de candidiasis (Figura 28).

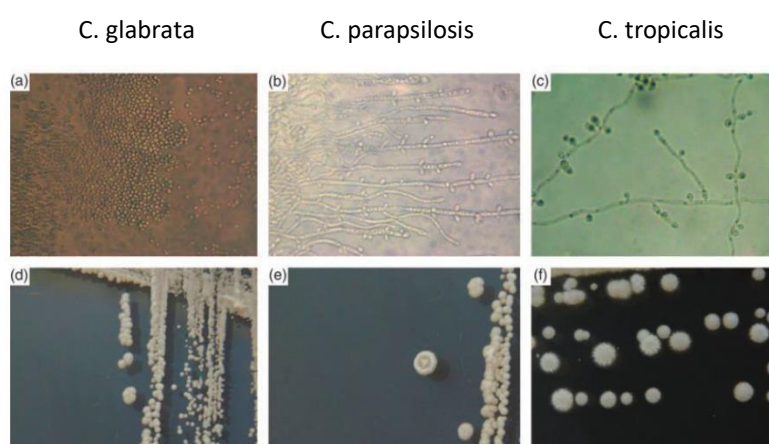


Figura 28. Microscopía de: a) *C. glabrata*, b) *C. parapsilosis*, c) *C. tropicalis*; colonias macroscópicas de a) *C. glabrata*, b) *C. parapsilosis*, c) *C. tropicalis*.

En términos de diagnóstico, los métodos empleados para determinar candidiasis continúan siendo problemáticos. Una confirmación microbiológica en cultivos de sangre puede ser (aún en candidiasis severas) errónea en un 50%⁷²; cultivos positivos de orina o de superficies mucosas no indican necesariamente una enfermedad invasiva. Además de esto, la virulencia difiere entre especies de *Candida*, así como su susceptibilidad a fármacos, haciendo entonces a la identificación adecuada, un evento importante en el tratamiento clínico. Para esto, el uso de fluorescencia⁷³ al momento de realizar un diagnóstico, puede aumentar la sensibilidad en la observación, permitiendo distinguir entre dichas especies de células normales. En la actualidad, pese a la aplicación de los múltiples fármacos disponibles en el mercado, las micosis son

⁶⁸ Lass-Flörl, C. *Mycoses*, **2009**, *52*, 197-205.

⁶⁹ Calderone, R.A. *Candida and Candidiasis*, **2002**, ASM Press, 15-25.

⁷⁰ Samaranayake, L.P.; Fidel, P.L.; Naglik, J.R.; Sweet, S.P. *Oral Dis.*, **2002**, *8*, 151-160.

⁷¹ Ruan, S.; Hsueh, P. *J. Med. Assoc.*, **2009**, *108*, 443-451.

⁷² Ellepola, A.N.B.; Morrison, C.J. *J. Microbiol.*, **2005**, *43*, 65-84.

⁷³ Pfaller, M.A. *Mycopathology*, **1992**, *120*, 65-72.

reconocidas como las causas más importantes de mortalidad y morbilidad en pacientes inmunocomprometidos⁷⁴.

El desarrollo de agentes antifúngicos se ha enfrentado a problemas como la falta de especificidad sobre el agente fúngico, y con la resistencia a los mismos que se ha convertido en un fenómeno clínicamente persistente, ya sea dependiendo del fármaco o de la especie de *Candida*, el mecanismo de resistencia puede ser inherente o adquirido; de cualquier forma, es un problema que va en aumento. En la Tabla 15, se describe de manera general una comparación de resistencia a fármacos entre las distintas especies de *Candida* (S=susceptible, SDD= susceptible dosis dependiente, R=resistente)⁷⁵.

Tabla 15. Susceptibilidad de especies NCAC.

Antifúngico	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
Polienos	Disrupción de la membrana celular			
Anfotericina B	S	S	S	S a I
Azoles	Inhibición de la síntesis de ergosterol			
Fluconazol	S	S	S	SDD a R
Itraconazol	S	S	S	SDD a R
Voriconazol	S	S	S	SDD a R
Posoconazol	S	S	S	S
Ravuconazol	S	S	S	S
Equinocandinas	Inhibición de la síntesis de β 1,3-glicano			
Caspofungina	S	S	S	S

2.1.4 CYP450

La proteína Lanosterol 14 α -demetilasa (CYP51) es un miembro de la superfamilia del citocromo P450, la cual cataliza la remoción oxidativa del 14 α -metilo (C-32) del lanosterol para dar intermediarios Δ 14,15-insaturados en la biosíntesis del ergosterol en diferentes reinos biológicos, tales como hongos, plantas avanzadas, y mamíferos. Ya que esta familia de enzimas son proteínas unidas a membrana, su estudio mediante cristalografía de rayos X había sido difícil de realizar hasta hace poco tiempo. Agentes antifúngicos azólicos inhiben el citocromo P450 esterol 14 α -demetilasa (14DM, CYP51), enzima clave para la biosíntesis de ergosterol por un mecanismo en el que el átomo de nitrógeno heterocíclico se une al átomo de hierro del grupo hemo en el sitio de unión de la enzima (Figura 29)⁷⁶.

⁷⁴ Pfaller, M.A.; Castanheira, M.; Messer, S.A.; Moet, G.J.; Jones, R.N. *Diagn. Micr. Infec. Dis.* **2010**, *68*, 278-283.

⁷⁵ Silva, S.; Negri, M.; Henriques, M.; Oliveira, R.; Williams, D.W.; Azeredo, J. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 288-305.

⁷⁶ Bossche, H. V. *Mycoses*, **1998**, 32-38.

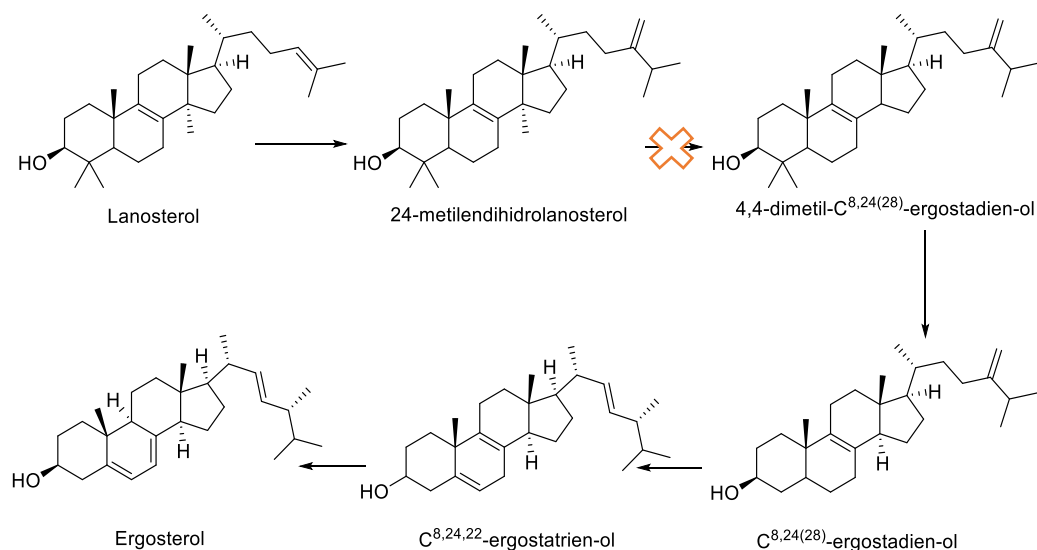


Figura 29. Interrupción de los antifúngicos en la biosíntesis de ergosterol.

El agotamiento de ergosterol resultante y la acumulación de precursores de esteroides 14 α -metilado alteran la estructura de la membrana plasmática, por lo que es más vulnerable a daños mayores, y alterar las actividades de varias enzimas unidas a la membrana⁷⁷. Debido a la existencia de CYP51 en los hongos y los mamíferos, la inhibición selectiva de 14 α -DM en el hongo es muy importante.

2.2 JUSTIFICACIÓN

Con base a lo previamente reportado en la literatura, se sabe que existe actualmente la necesidad de desarrollar nuevas moléculas con actividad antifúngica efectiva, que además eviten problemas de efectos secundarios sin perder potencia. Para ello, se plantea hacer uso de la hibridación molecular de triazol-cumarina con la finalidad de formar moléculas que potencialicen sus propiedades farmacológicas, teniendo como plataforma a dos moléculas bioactivas con propiedades antifúngicas y características farmacológicas deseables (permeabilidad, resistencia al metabolismo, etc.).

Además, siendo aún necesario saber el mecanismo por el cual se puede llevar a cabo la inhibición de crecimiento de los hongos, el utilizar moléculas que presenten actividad fluorescente, puede resultar útil al momento de la elucidación de dicho mecanismo y de esta forma hacer que las moléculas propuestas sean útiles en los campos de la biología, química y farmacia.

⁷⁷ Georgopapadakou, N. H.; Walsh, T.J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 279-291.

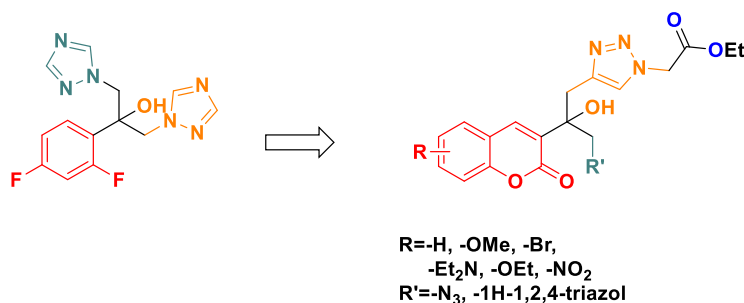
2.3 HIPÓTESIS

A pesar de que no existen productos naturales funcionalizados con el grupo azida ni tampoco con 1,2,3-triazoles; existen en la literatura varias series de compuestos activos con estos grupos funcionales. Se espera que al funcionalizar una estructura con ellos, se observe un aumento en la potencia antifúngica. Por otro lado, un análogo de fluconazol (es decir, un compuesto que contenga 2 triazoles) utilizando como núcleo base una cumarina, presentará una actividad antifúngica superior a la cumarina sin funcionalizar.

Finalmente, se espera que las propiedades fluorescentes de las estructuras sean útiles para conocer su localización celular y de esta forma poder inferir el mecanismo de acción.

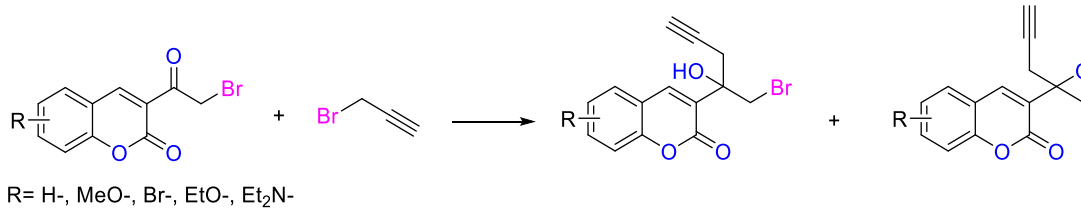
2.4 OBJETIVO GENERAL

Obtener una serie de derivados de cumarina funcionalizados con un anillo de 1,2,3-triazol, el grupo funcional azida, o 1,2,4-triazol. Realizar un estudio *docking* pertinente y su evaluación biológica frente a cepas de *Candida*.

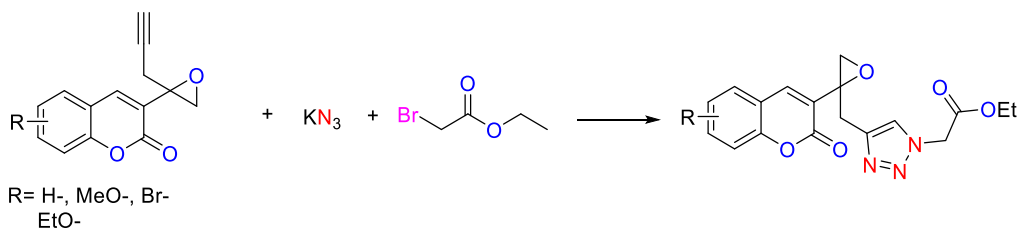


2.5 OBJETIVOS ESPECIFICOS

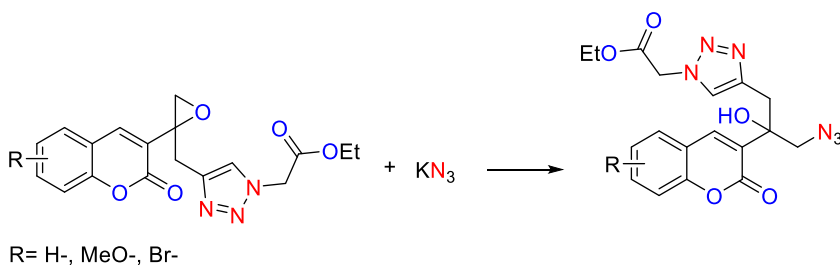
- Diseño *in silico* y evaluación *docking* de las moléculas propuestas.
- Sintetizar y caracterizar las cumarinas con alquinos terminales.



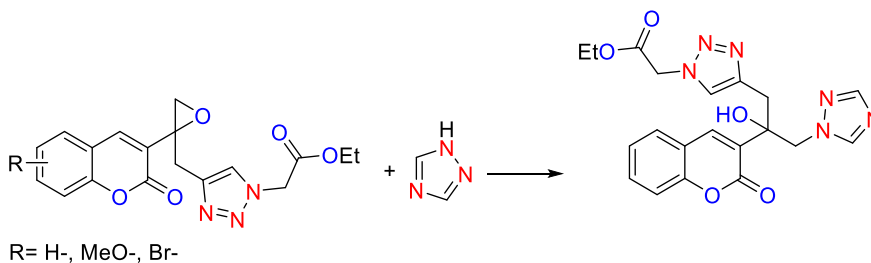
- Sintetizar y caracterizar los 1,2,3-triazoles producidos mediante química “click”.



- Realizar la apertura de anillo de oxirano, usando azida como nucleófilo; y la caracterización de los compuestos obtenidos.



- Realizar la apertura de anillo de oxirano usando 1,2,4-triazol como nucleófilo; y la caracterización de los compuestos obtenidos.



- Realizar la evaluación biológica de los compuestos obtenidos en diferentes cepas de hongos, como *C. albicans*, *C. parapsilopsis*, *C. cruzei*, etc.

2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.6.1 ESTUDIO DOCKING

La estructura tridimensional del CYP51 ha sido determinada mediante difracción de rayos X, encontrándose registrada en el *Protein Data Bank* (PDB) con el código identificador 2VKU (Figura 30). Se trata de la isoforma proveniente de *Mycobacterium tuberculosis* expresada en *E. coli*. Esta proteína es útil para realizar los cálculos puesto que presenta una elevada similitud estructural con un citocromo fúngico, si en existe interacción con 2VKU, se nos asegura una alta probabilidad de que también la halla en las especies fúngicas. Se encuentra co-cristalizada con la 4,4'-dihidroxibenzofenona, ligando que fue empleado para realizar el *docking* ciego y la calibración.

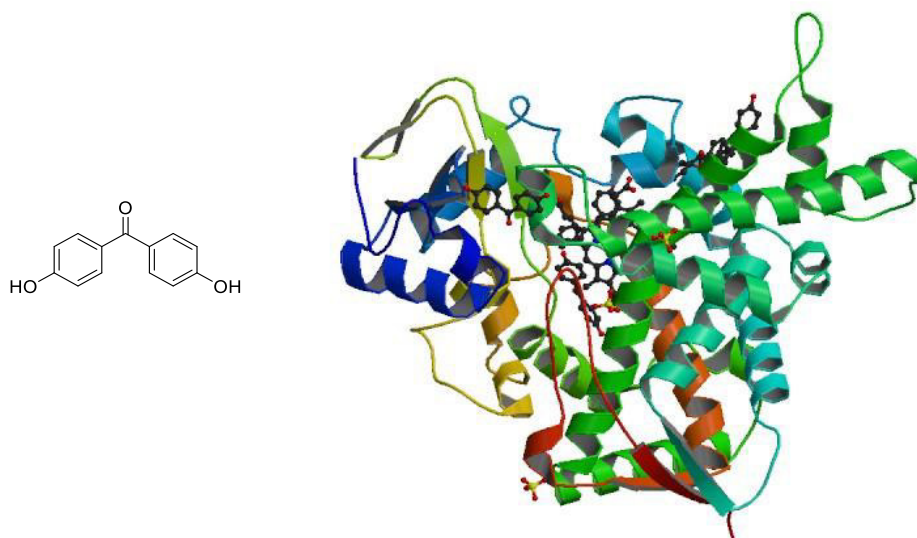


Figura 30. Estructura de Rayos X de 2VKU con 4,4'-dihidroxiacetofenona.

El cálculo de los acoplamientos moleculares fue realizado empleando la suite *AutoDock 4.2*, mediante la interfaz gráfica *AutoDock Tools*. Para validar y calibrar el proceso de *docking*, se empleó como ligando la molécula 4,4'-dihidroxiacetofenona co-cristalizada con la proteína. En un primer paso fue realizado un *docking* ciego, sin limitar el espacio de búsqueda. Para ello se utilizaron los parámetros de red que se presentan a continuación:

Tabla 16. Parámetros de red usados en el *docking* ciego.

Parámetro	Valor asignado
Puntos en x	126
Puntos en y	126
Puntos en z	118
Resolución de los puntos (Å)	0.4305556
Centro de la red (x,y,z)	19.657, 36.558, 34.932

Con estos parámetros se abarca toda la proteína 2VKU. Para encontrar las conformaciones de menor energía se emplea como algoritmo de búsqueda *Lamarckian Genetic Algorithm*. Este coloca los parámetros del ligando (posición de los átomos y grados de libertad) como si fuera un "genotipo", y a través de operaciones "genéticas" (mutación, recombinación, etc) se obtienen nuevas conformaciones (similar a lo que serían los descendientes), pero sólo aquellos con las mejores características (conformaciones con valores de interacción más altos) obtenidas por la función de evaluación son seleccionados y los demás se descartan. Los parámetros empleados para el algoritmo genético en todos los procesos de *docking* se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Parámetros de búsqueda empleados por el algoritmo.

Parámetro	Valor
Número de individuos en la población	150
Número de evaluaciones de energía	2500000
Número máximo de generaciones	27000
Número de individuos que sobreviven a la siguiente generación	1
Velocidad de mutación	0.02
Velocidad de recombinación	0.8

El resultado mostró las 6 conformaciones de menor energía localizadas en la misma cavidad ocupada por el ligando de forma experimental (valores de RMSD \approx 1.15, es decir que existe una elevada similitud entre la posición en el sitio activo de los átomos de las mejores conformaciones), reproduciendo así el resultado experimental. Tras la confirmación del sitio de búsqueda, fue originada una nueva red para afinar los parámetros, aumentando su resolución (al disminuir la distancia entre los puntos) y limitando la búsqueda a la cavidad del sitio activo. Los nuevos parámetros de red, obtenidos por la calibración y aplicados al resto de los cálculos, se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Parámetros utilizados para delimitar la búsqueda a la cavidad del sitio activo.

Parámetro	Valor asignado
Puntos en x	70
Puntos en y	96
Puntos en z	82
Resolución de los puntos (Å)	0.2916
Centro de la red (x,y,z)	20.657, 40.702, 33.235

Cada una de las moléculas candidatas fue sometida a cálculo de acoplamiento en *AutoDock*, usando los parámetros de red obtenidos en la calibración y empleando el algoritmo de búsqueda *Lamarckian Genetic Algorithm*, con los mismos parámetros empleados en los procesos de *docking* ciego y calibración. Las estructuras moleculares de cada candidato fueron modeladas en *Spartan* o *Avogadro*, optimizando la geometría a su mínima energía mediante cálculos de mecánica molecular.

En la Tabla 19 se muestran los resultados de los cálculos en relación con cada estructura (Figura 31), incluyendo los cálculos de energía de enlace, eficiencia de ligando y constante de inhibición calculada. Estos datos son únicamente de la conformación de mínima energía.

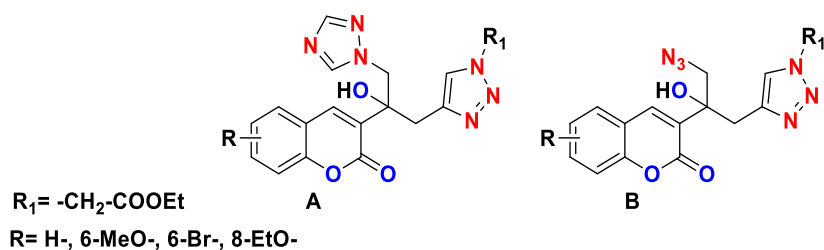


Figura 31. Estructura general de las moléculas evaluadas en el *docking*.

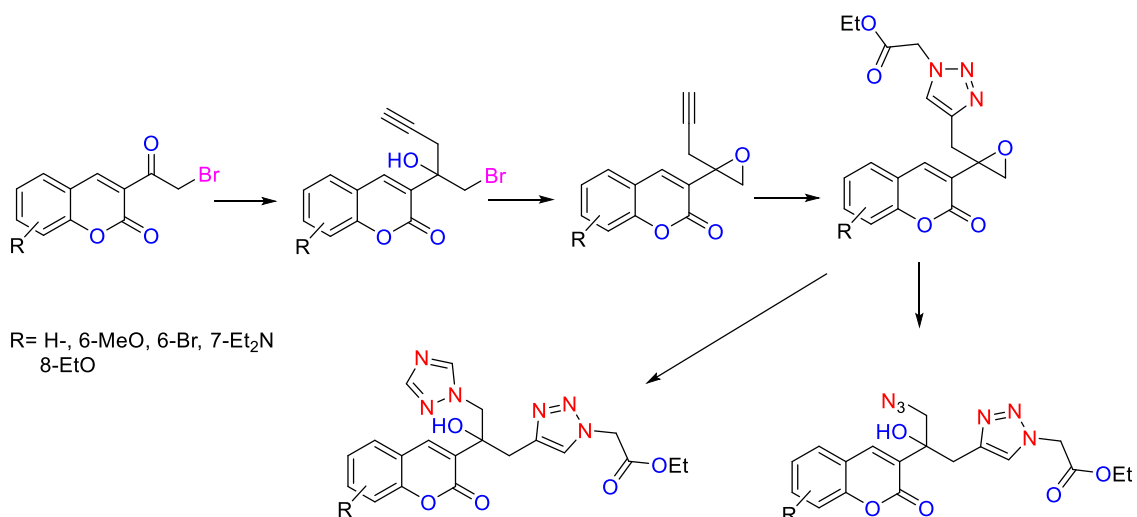
Tabla 19. Resultados del acoplamiento *docking* para las moléculas de cumarina-bitriazol y cumarina-azida.

Molécula	H		MeO-		Br-		EtO-	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Energía mínima calculada (kcal/mol)	-9.65	-9.33	-9.41	-9.49	-9.75	-10.76	-9.81	-10.55
Eficiencia de ligando (kJ/mol)	-0.27	-0.29	-0.27	-0.29	-0.27	-0.32	-0.25	-0.30
Constante de inhibición para la conformación de mínima energía (nM)	83.74	144.1	125.73	110.84	83.86	12.98	64.24	18.52

En general, la variación estructural con mayor efecto en la disminución de la energía de enlace es que las moléculas posean el bromo como sustituyente en el anillo aromático. Todas las estructuras de la serie halogenada tuvieron un decremento notable en la energía en comparación con los otros congéneres estructurales (mientras menor sea dicho valor expresado en Kcal/mol, más eficiente es la unión de la conformación dentro del sitio activo calculada). Dentro de esta serie, el derivado bromado que además de contener el anillo de 1,2,3-triazol contiene un grupo azida que tuvo la energía de enlace más pequeña. Al examinar las constantes de inhibición calculadas mostradas en la Tabla 19, se observa que siguen la misma tendencia que la energía enlace, de esta forma la molécula con bromo y azida mantiene la mejor constante de inhibición predicha. Los valores mostrados en nM, son valores predichos por el programa basándose únicamente la energía mínima calculada para cada molécula.

2.6.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Para obtener las moléculas análogas de fluconazol, se diseñó la siguiente ruta de síntesis (Esquema 8).

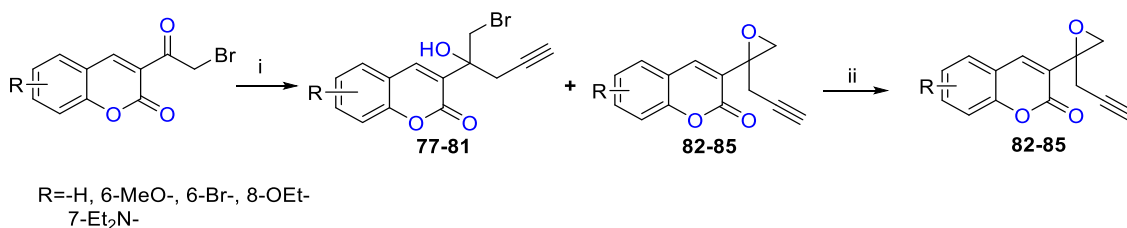


Esquema 3. Ruta de síntesis planteada para la síntesis de los análogos de fluconazol.

Para la síntesis de las cumarinas α -halogenadas (las cuales son la materia prima de esta ruta propuesta) se reproduce la metodología previamente reportada por el grupo de investigación, usando las 3-acetilcumarinas y NBS como agente halogenante en acetonitrilo y adicionando ácido tricloroacético. Estas moléculas se obtuvieron en rendimientos moderados a buenos (70-90%), y fueron usadas como material de partida para realizar una reacción de adición al carbonilo. Dicha reacción es una variante de la reacción de Barbier, donde el nucleófilo se forma a partir de un bromuro de propargilo y Zn^0 , los disolventes reportados en la bibliografía pueden ser desde H_2O , hasta éter anhidro. Para este caso, las mejores condiciones de reacción fueron utilizando una mezcla de DMF/éter etílico (v/v 1:1) ambos anhidros, lo que permitió disolver los derivados de cumarina y generar *in situ* el reactivo de Barbier, a una temperatura de 50 °C; el motivo del aumento de temperatura es que se observa que al mismo tiempo de que se realiza la adición al carbonilo, se lleva a cabo una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) intramolecular entre el alcohol terciario y el carbono base de halógeno, formando así el oxirano esperado en una sola etapa de síntesis y la temperatura aumenta la proporción de dicho producto en menor tiempo de reacción.

Aún con esto, se observó que una proporción de alcohol propargílico se mantiene sin transformación, así que después de realizar una columna cromatográfica para aislar cada producto, el alcohol propargílico se sometió a una reacción con KOH en acetonitrilo a 50 °C para obtener el oxirano esperado en 1 h de reacción. Las condiciones de reacción se muestran a continuación y los rendimientos de cada transformación son enlistados en la Tabla 20.

Tabla 20. Rendimientos de la reacción de Barbier y formación del oxirano.^a



Exp.	R.	T (°C)	t (h)	i (%R)		
				77-81	82-85	82-85
1	H	t.a.	24	50	50	---
				30	70	80
2	6-MeO-			20	80	70
3	7-Et ₂ N-	50	1	61	0	---
4	6-Br-			50	50	80
5	8-EtO-			30	30	80

^a i) Zn⁰ (1.2 mol), bromuro de propargilo (1.2 mol), DMF/Éter (1:1); ii) KOH (1.2 mol), CH₃CN, 50 °C, 1h.

La Figura 32, muestra el espectro de hidrógeno de un alcohol propargílico, correspondiente al compuesto **80**, aquí se observa el desdoblamiento de las señales pertenecientes al metileno base de alquino (*ddd*), y al metileno base de bromo (*dd*), así como la señal del alquino terminal. En la Figura 33, se muestra el oxirano formado por la ciclación intramolecular del oxígeno con el metileno base de halógeno, para este espectro se resalta que existe un cambio en el desplazamiento químico del metileno base de bromo y a pesar de que muestra la misma multiplicidad, las constantes de acoplamiento (*J*) son las reportadas en la literatura para oxiranos siendo *J*=5 Hz. Por su parte en la Figura 34, se observa la difracción de rayos X correspondiente al experimento 1 (molécula **82**), donde se corrobora la presencia del anillo del oxirano y la presencia del enlace triple; en el diagrama ORTEP se observa la distribución espacial de los átomos, los carbonos rotulados como C13 y C14 son los correspondientes al alquino terminal y muestran una distancia de 1.167 Å, lo correspondiente a la distancia esperada, además se observa que el anillo de oxirano está en una orientación opuesta en el plano al alquino. De forma paralela a la síntesis de los compuestos finales, se observaron diferentes comportamientos para los derivados con sustituyentes 7-Et₂N- y 8-EtO-, por ejemplo, al momento de buscar sintetizar el oxirano de la entrada 3 (Tabla 20), se obtuvo un alcohol primario, molécula **86**; este comportamiento puede ser atribuido al sustituyente en el núcleo de la cumarina pues ejerce un efecto de donación electrónica que favorece la apertura del anillo del oxirano y posteriormente la formación del alcohol (Figura 35).

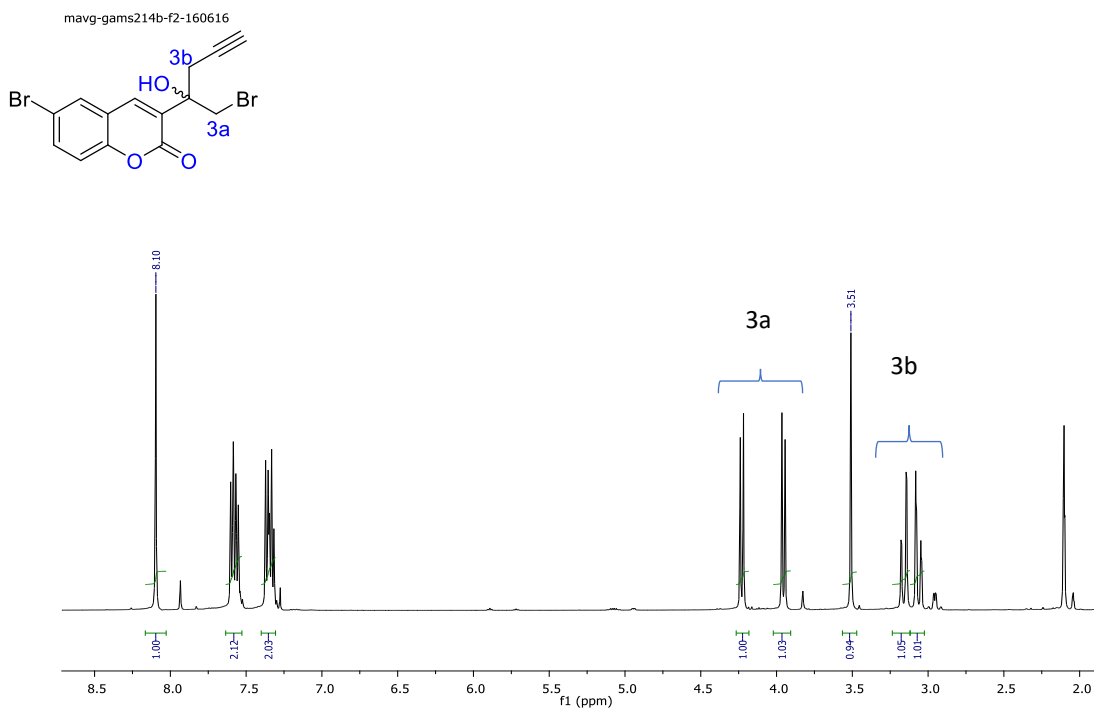


Figura 32. Espectro RMN- ^1H del alcohol propargílico de la molécula **80** en CDCl_3 , 500 MHz.

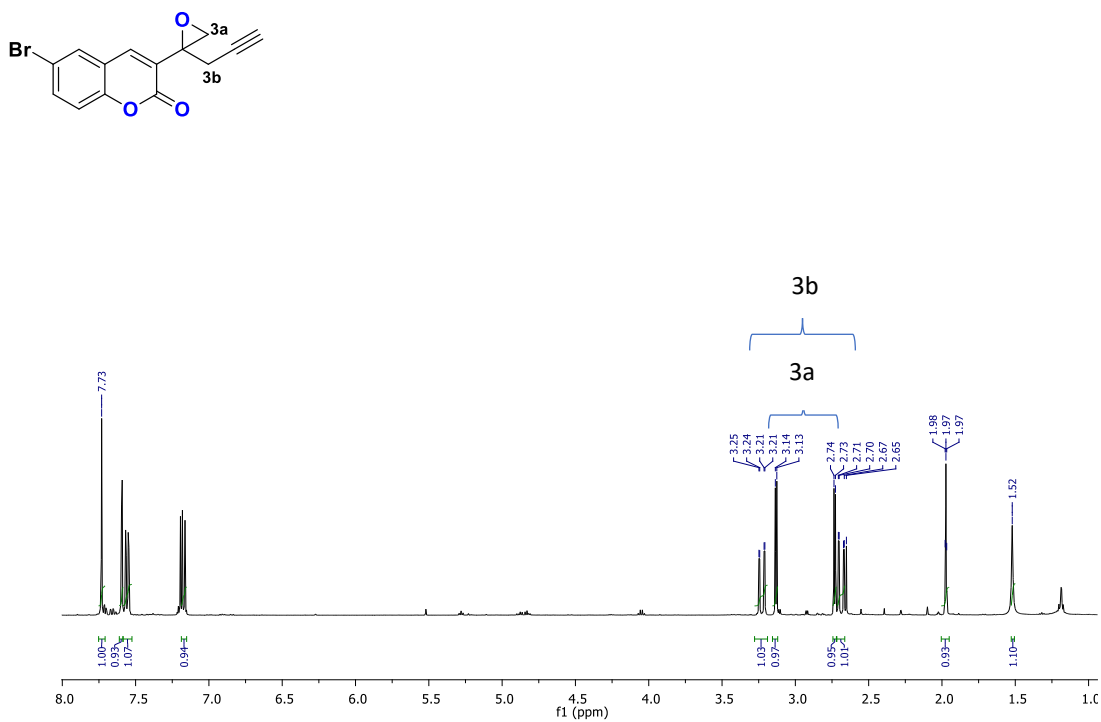


Figura 33. Espectro RMN- ^1H del oxirano de la molécula **84** en CDCl_3 , 500 MHz.

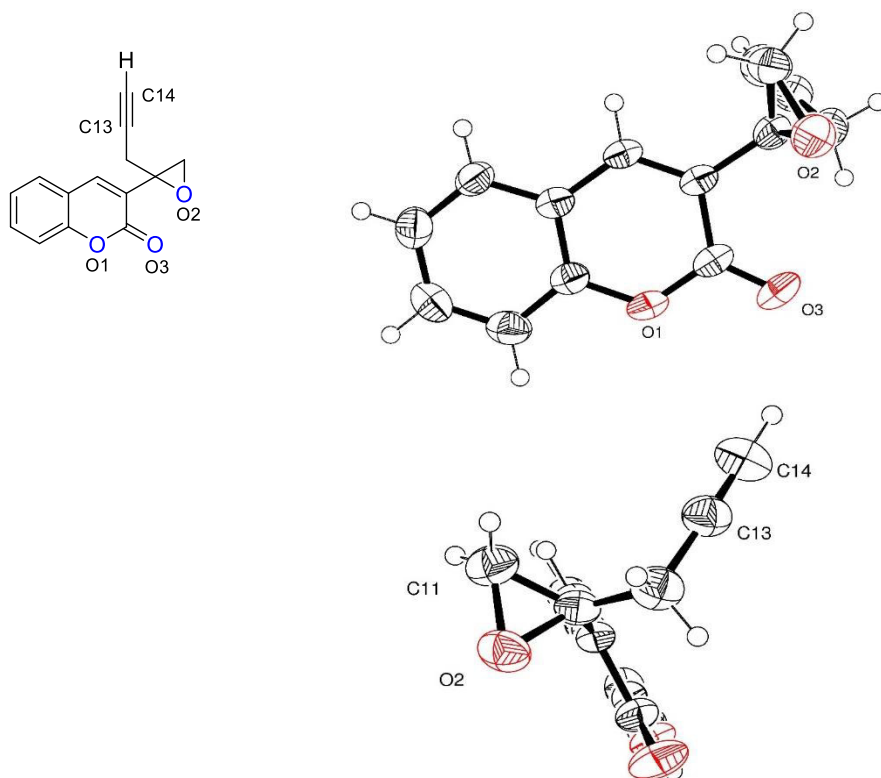


Figura 34. Difracción de rayos X para el oxirano **82**, oxígenos en rojo.

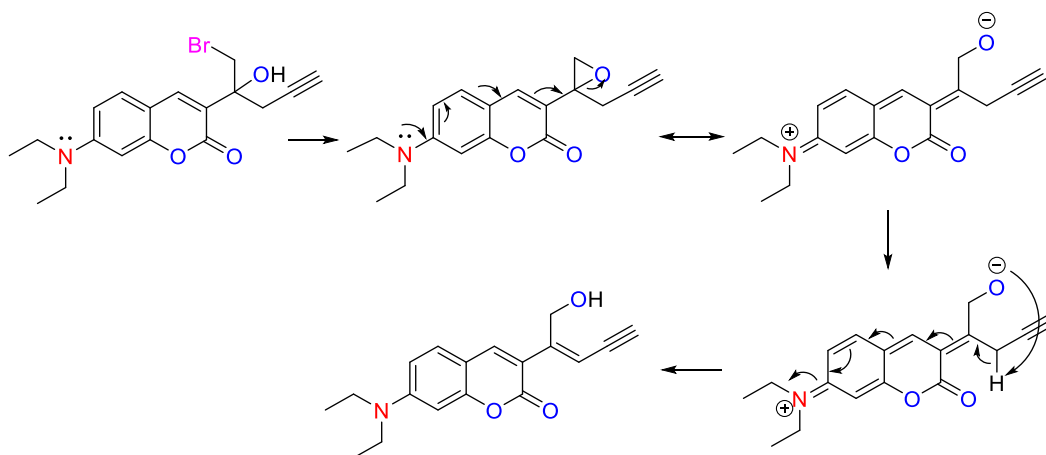


Figura 35. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de **86**.

Con el sustituyente EtO⁻ en la posición 8, al realizar la reacción de Barbier, el producto mayoritario es un aleno (molécula **87**), seguido del alquino terminal y el oxirano correspondiente. En la bibliografía existen algunos reportes de la isomerización de alquinos terminales al aleno, mediante el uso de especies metálicas que facilitan la migración 1,3-H de un hidrógeno del carbono base del alquino, pero las especies usadas son complejos metálicos^{78,79}, lo que nos da

⁷⁸ Huang, X.; Ma, S. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 1301–1312.

⁷⁹ Rochat, R.; Yamamoto, K.; Lopez, M. J.; Nagae, H.; Tsurugi, H.; Mashima, K. *Chem.-A Eur. J.* **2015**, *21*, 8112–8120.

pie a pensar que el metal (Zn) que va cambiando de estado de oxidación durante la reacción y está involucrado de forma directa para que se forme este producto, pero para entender este comportamiento, hacen falta más estudios de reactividad, puesto que el sustituyente no ejerce un efecto electrónico significativo como en el caso anterior, ni tampoco un cambio drástico en volumen; por tanto, aún queda pendiente el mecanismo por el cual se favorece.

En la Figura 36, se muestra el espectro de hidrógeno del producto y se observa la multiplicidad correspondiente al aleno siendo una señal triple con desplazamiento 5.81 ppm para el hidrógeno del carbono base de **87** y un triple de dobles (*td*) para los hidrógenos del carbono terminal en 4.99 ppm; en la Figura 37, se muestra el espectro de carbono del mismo compuesto donde se observa el desplazamiento del carbono del aleno en 206 ppm. Por último, en la Figura 38, se muestra el espectro IR del compuesto, se señalan las bandas principales correspondientes a las vibraciones del enlace ($=CH_2$) en 2977 cm^{-1} y del grupo funcional aleno ($-C=C=C-$) en 1956 cm^{-1} .

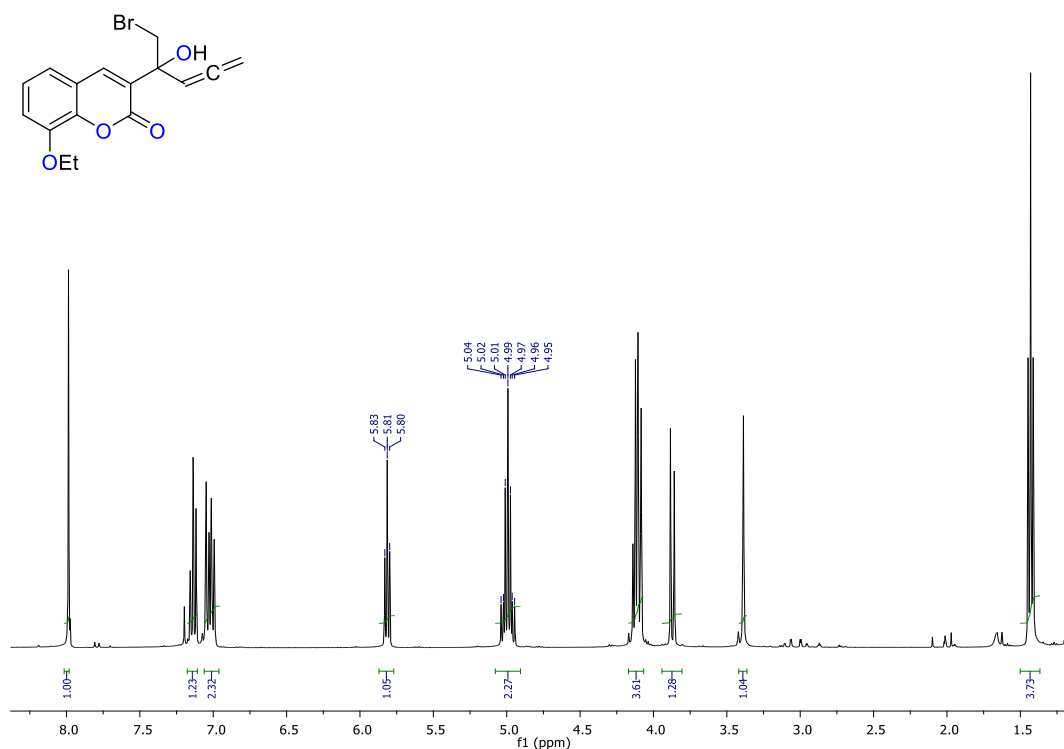


Figura 36. Espectro RMN- ^1H del aleno **87** en CDCl_3 , 500 MHz.

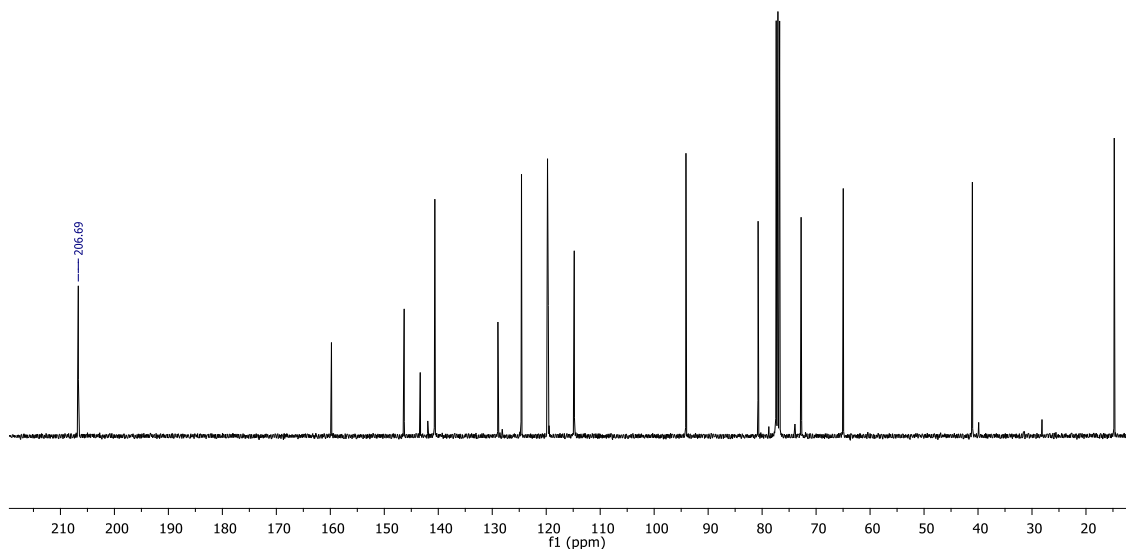


Figura 37. Espectro RMN-¹³C del aleno **87** en CDCl₃, 125 MHz.

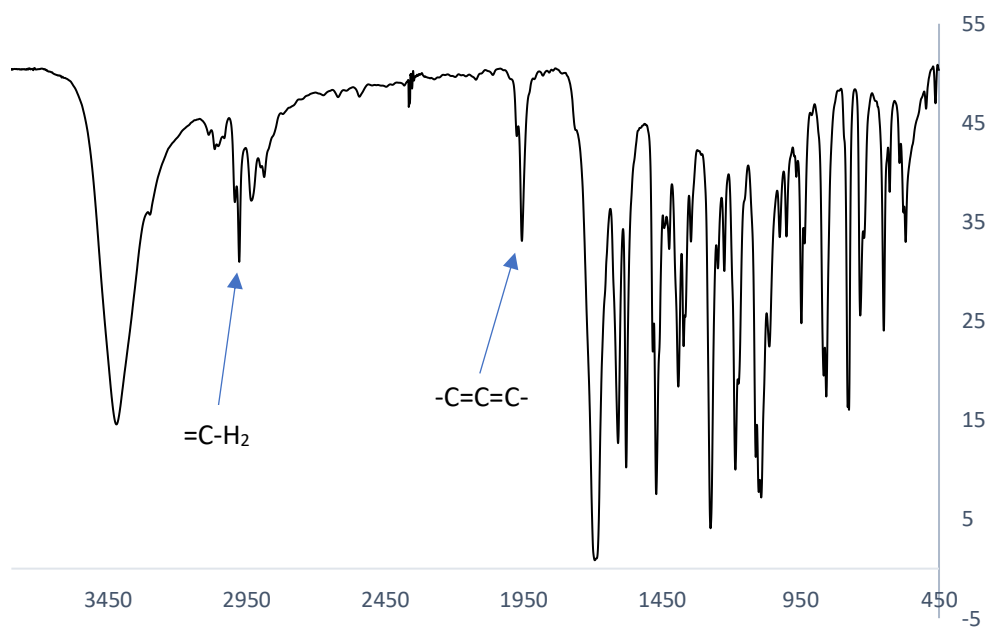


Figura 38. Espectro IR del aleno **87** en KBr.

En la Tabla 21, se resumen los desplazamientos de los carbonos propargílicos, los de base de halógeno y los del oxirano de las moléculas sintetizadas en ppm, así como también las constantes de acoplamiento obtenidas.

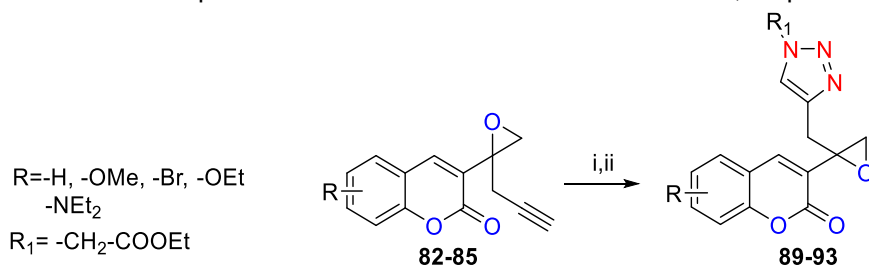
Tabla 21. Desplazamientos δ (en ppm) y constantes de acoplamiento J (en Hz) para los compuestos obtenidos.

No.	R	δ 3a	J 3a	δ 3b	J 3b	δ Oxirano	J Oxirano
82	H-	4.09	10.6	3.11	17.0	3.02	5.0
83	6-MeO-	4.09	10.6	3.11	16.9	2.93	5.0
84	6-Br-	4.00	10.6	3.02	17.0	2.93	5.0
85	8-EtO-	4.02	10.6	3.03	16.9	2.95	4.9
86	7-Et ₂ N-	4.09	10.5	3.08	16.9	---	---

Una vez que se caracterizaron y elucidaron los oxiranos correspondientes, se procedió a trabajar con el alquino terminal, usándolo como sustrato para realizar una reacción de cicloadición 1,3-dipolar para generar el 1,2,3-triazol 1,4-disustituidos. Para este objetivo se utilizó la metodología reportada por Ouahrouch *et al*⁸⁰, donde se genera la azida orgánica *in situ* a partir de azida de potasio y bromoacetato de etilo, para ello, primero se utilizó DMSO como el disolvente de elección, y los compuestos se obtenían en rendimientos moderados entre 50-80%, pero para dos derivados la reacción no procedió, por tal motivo se hizo una modificación cambiando el disolvente por DMF, resultando no solo en un aumento de los rendimientos de reacción, sino que también ahora la metodología funcionaba para todos los derivados. En la Tabla 22, se representa la ecuación general de la reacción con las condiciones de reacción empleadas, así como se registra una comparativa en los rendimientos de cada metodología.

En la Figura 39 se muestra el espectro de hidrógeno del experimento 1 (molécula **89**), se observa que desaparecen las señales correspondientes al alquino terminal y en su lugar aparece una señal en aproximadamente 7.5 ppm correspondiente al protón vinílico del triazol, además aparece el triplete y el cuadruplete correspondiente al éster; otra característica importante es que al utilizar estas condiciones de reacción no solo se lleva a cabo la cicloadición sino que se evita que la azida actúe como nucleófilo causando la apertura del epóxido, prueba de ello es que el metileno del mismo sigue presentando una $J=5$ Hz.

Tabla 22. Comparación de los rendimientos de la reacción 1,3-dipolar.^a



Exp.	No.	R	%R (i)	%R (ii)
1	89	H-	67	70
2	90	6-MeO	70	80
3	91	6-Br	--	60
4	92	8-EtO	--	70

⁸⁰ Ouahrouch, A.; Taourirte, M.; Schols, D.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Engels, J.W.; Lazrek, H.B. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2016**, *349*, 30-41.

5	93	7-NEt ₂	60	50
---	-----------	--------------------	----	----

a) i) KN₃ (1.2 mol), etil bromoacetato (1 mol), CuSO₄ (0.05 mol), Ascorbato de sodio (0.4 mol), 2 ml DMSO, 0.5 mL H₂O, 50 °C, 1 h; ii) KN₃ (1.2 mol), etil bromoacetato (1 mol), CuSO₄ (0.05 mol), ascorbato de sodio (0.4 mol), 2 mL DMF, 0.5 mL H₂O, 50 °C, 1 h.

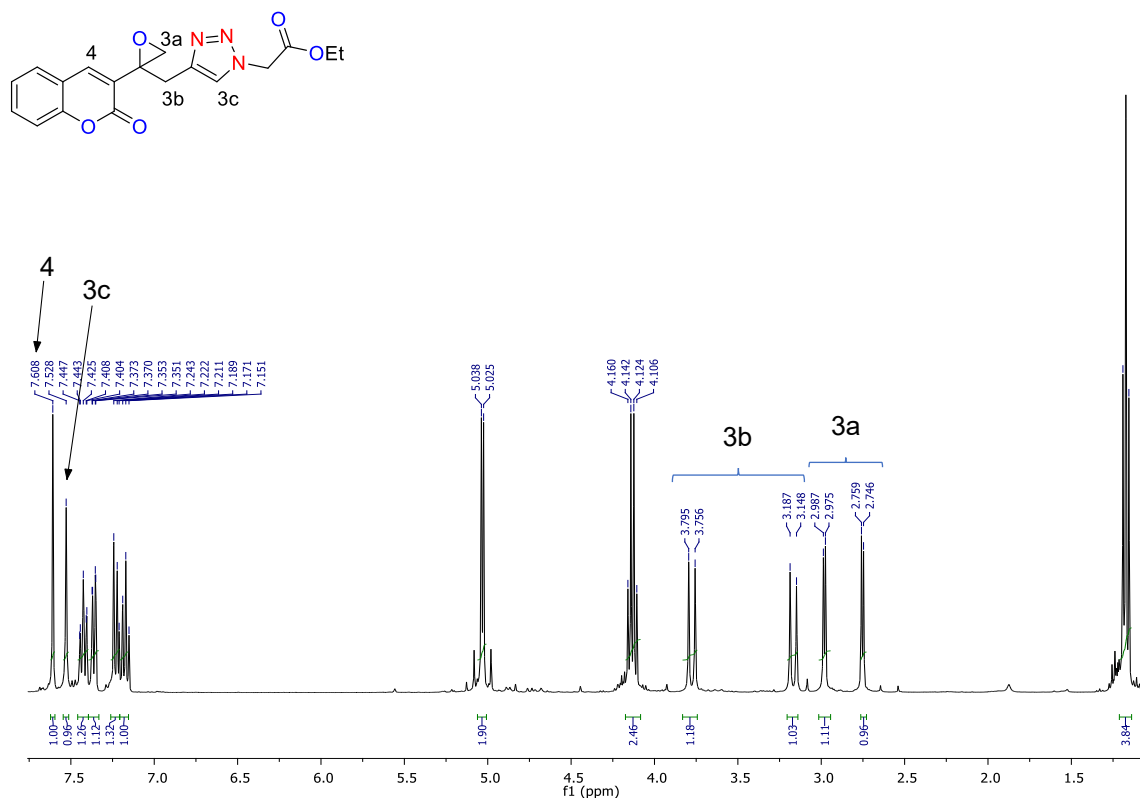


Figura 39. Espectro RMN-¹H de **89** en CDCl₃, 500 MHz.

En la Tabla 23, se describen los desplazamientos químicos en ppm correspondientes a la señal del protón vinílico del 1,2,3-triazol, así como los correspondientes al oxirano con su valor de *J*.

Tabla 23. Desplazamientos químicos δ en ppm y constantes de acoplamiento *J* en Hz de las estructuras obtenidas.

Exp.	No.	R	δ H (triazol)	δ H (oxirano)	<i>J</i> (oxirano)
1	89	H	7.50	2.87	4.9
2	90	6-MeO-	7.19	2.87	4.6
3	91	6-Br-	7.51	2.89	4.7
4	92	8-EtO-	7.54	2.85	4.8
5	93	7-Et ₂ N-	7.74	-	-

De la misma forma en la que se trabajó para obtener las moléculas triazol-oxirano, se hizo con el alcohol primario proveniente del derivado con Et₂N- (molécula **79**), la metodología fue la misma y después de realizar purificación por columna se logra aislar el triazol correspondiente con un rendimiento del 50%, en la Figura 40 se muestra el espectro de hidrógeno de la molécula **93** y se observan las señales características del protón vinílico del triazol (**3c**) en $\delta = 7.7$ ppm, se observa el metileno base de alcohol (**3a**) en $\delta = 5.1$ ppm, y el protón vinílico (**3b**) en $\delta = 7.0$ ppm. Por otra parte, en la Figura 41 se muestra la difracción de rayos X de la molécula obtenida, donde se corrobora el patrón de sustitución 1,4 del 1,2,3-triazol, y también la presencia del enlace doble C-C base del alcohol; en el diagrama ORTEP se puede apreciar la planaridad del sistema, lo que permite una conjugación completa de la molécula, además se corrobora que la distancia entre el carbono base del alcohol es de 1.34 Å comprobando que es un enlace doble C=C, por último se puede observar que el hidrógeno del alcohol tiene una interacción con el N2 de anillo de triazol, y que efectivamente el producto exclusivo de la reacción con cobre es el triazol 1,4-bisustituido.

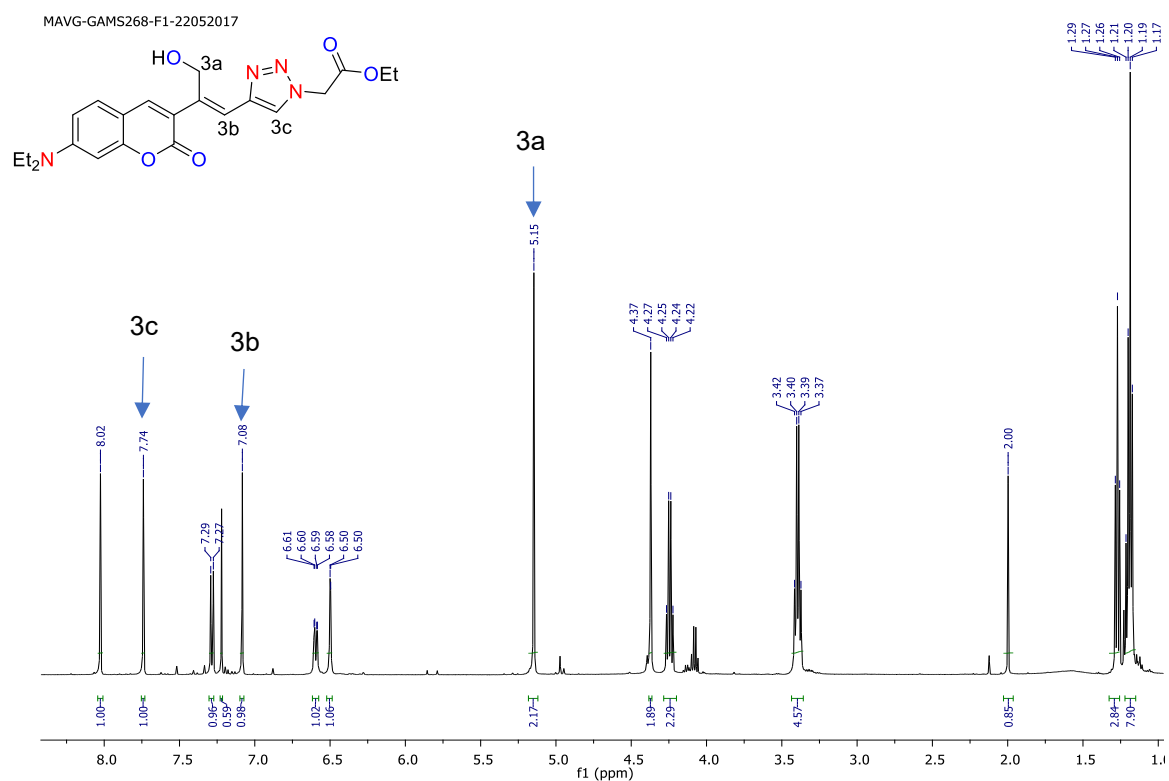


Figura 40. Espectro RMN-¹H de la molécula **93** en CDCl₃, 500 MHz.

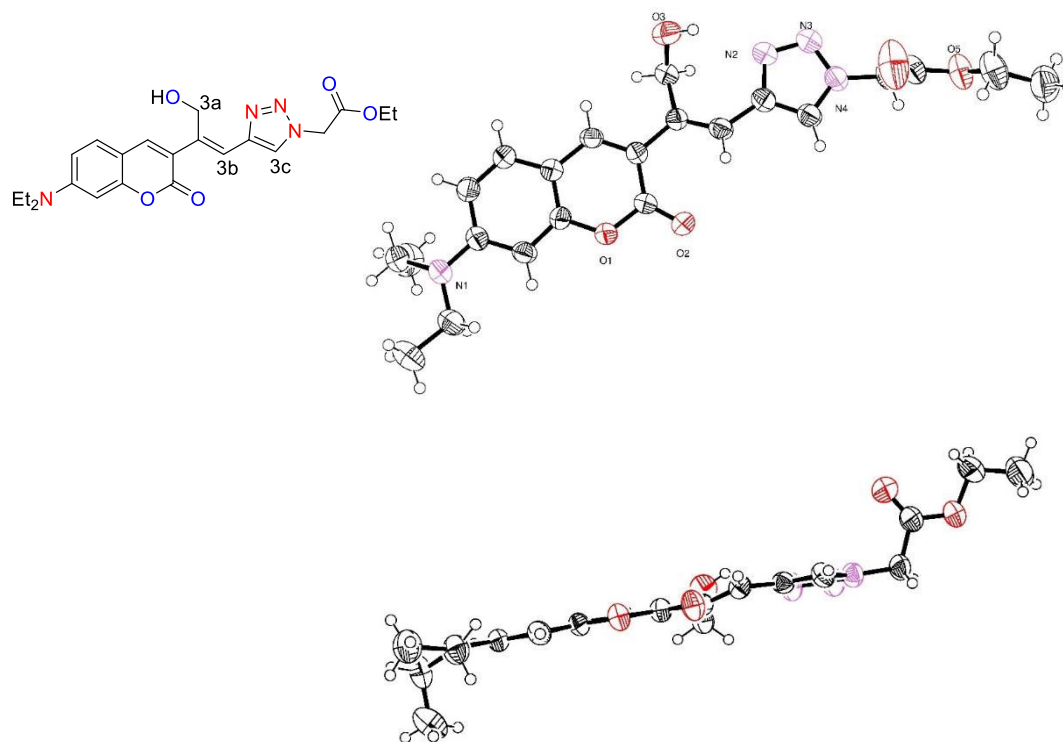
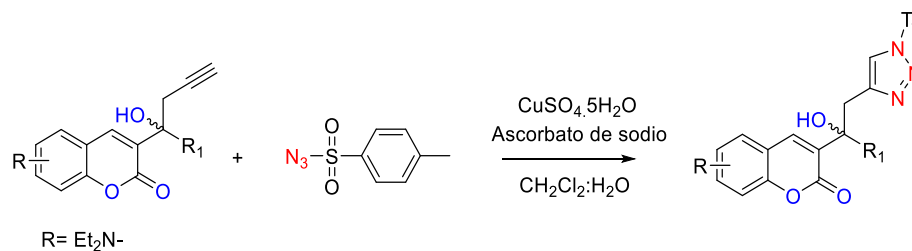


Figura 41. Difracción de rayos X de la molécula **93**, oxígenos en rojo, nitrógenos en morado.

A la par del trabajo realizado con los oxiranos, también se realizaron pruebas para obtener 1,2,3-triazoles a partir de los alcoholes terciarios con alquinos terminales, para este propósito se buscaron las mejores condiciones de reacción, para que el calor no promoviera la ciclación intramolecular, y a su vez permitiera obtener el 1,2,3-triazol 1,4-disustituido, buscando en la literatura se utilizó el procedimiento reportado por Lee *et al.*⁸¹ donde se reporta el uso de un sistema CH₂Cl₂:H₂O (1:1 v/v), que permita la solubilidad tanto de las moléculas orgánicas, como de las sales de cobre y del agente oxidante usado, mejorando la eficiencia de la reacción. El dipolo utilizado en esta etapa de síntesis se encuentra previamente sintetizado y comercializado por Sigma-Aldrich, y es la p-toluensulfonyl azida, estable a temperatura baja y fácil de utilizar. En la Tabla 24, se muestra la ecuación general de la reacción las mejores condiciones de reacción y además se muestran los rendimientos base pura de dicha reacción, en este caso se observa que no existe una diferencia significativa entre utilizar una molécula con metileno halogenado y otra con el trifluorometilo, puesto que la reacción está en el lado del alquino terminal. A su vez en la Figura 42, se muestra un espectro de hidrógeno de una de las moléculas obtenidas, se resalta la presencia del metilo del grupo tosilo, y la desaparición del protón del alquino, con la consecuente aparición del protón vinílico del 1,2,3-triazol.

⁸¹ Lee, B.-Y.; Park, S.R.; Jeon, H. B.; Kim, K. S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5105-5109.

Tabla 24. Rendimientos de reacción usando la azida orgánica.



Exp.	R	R ₁	T (°C)	t (h)	%R
1	7-Et ₂ N-	-CH ₂ Br	t.a.	1	75
2		-CF ₃			

mavg-GAMS129-260816

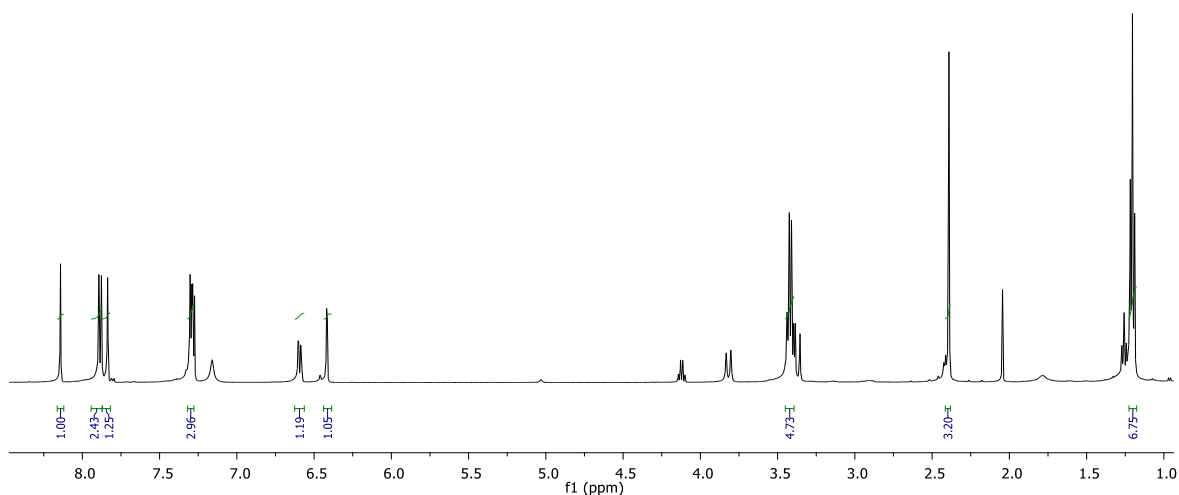
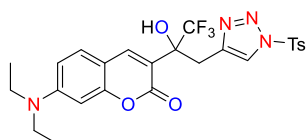


Figura 42. Espectro de RMN-¹H del compuesto **b** en CDCl₃, 500 MHz.

Al igual que en el caso de las moléculas oxirano-triazol, también se obtuvieron cristales de una molécula sintetizada usando *p*-toluenfulonilazida. La difracción de rayos X se muestra en la Figura 43, esta difracción corresponde a la molécula **88** de la Tabla 24, se puede apreciar que se mantiene el metileno base de Br-, y lo más importante es que solo se obtiene un regioisómero del triazol y es el 1,4-disustituido; además en la celda completa se observa que existen dos tipos de empaquetamientos, debido a los grados de libertad proporcionados por los enlaces C-C.

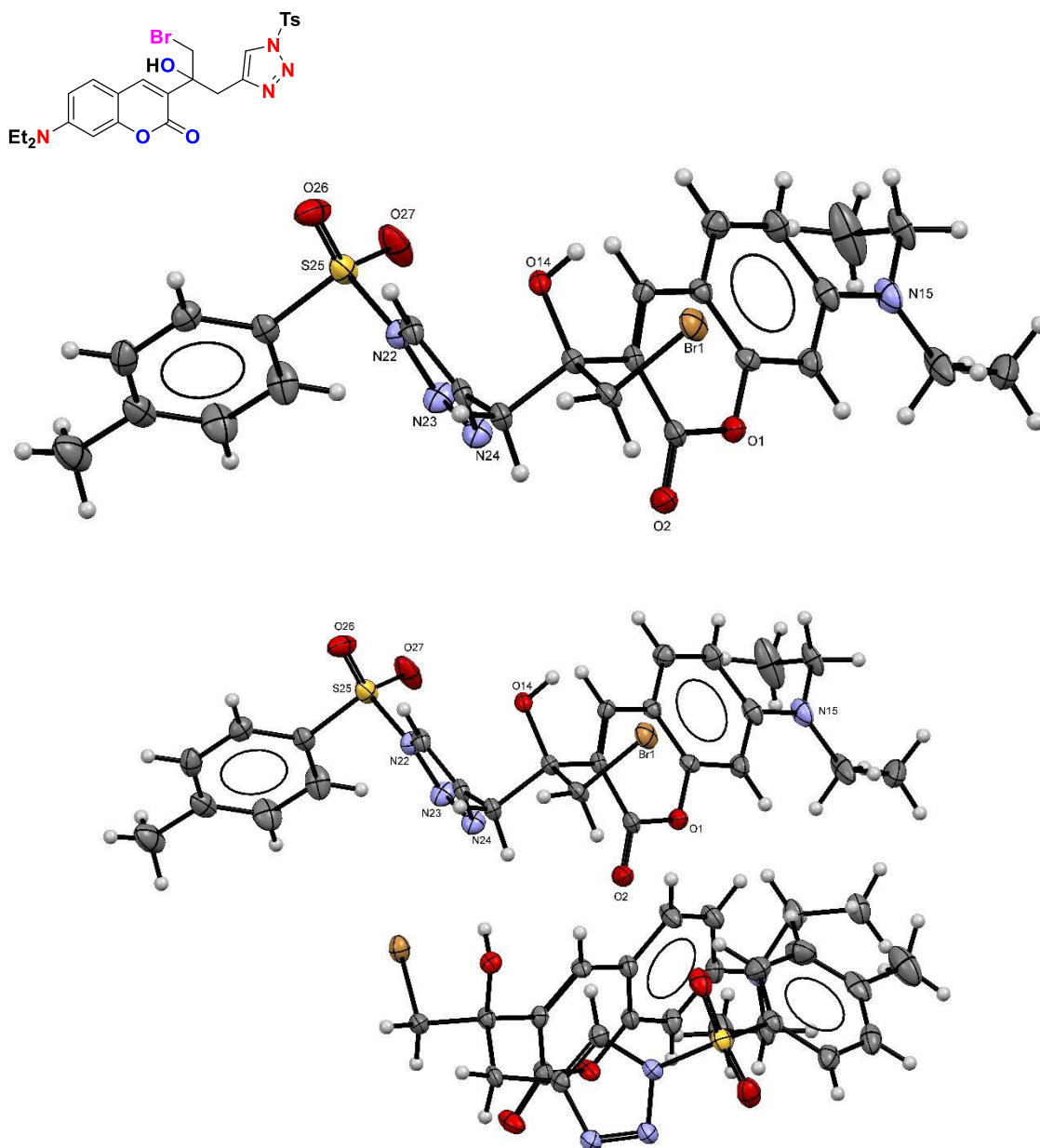
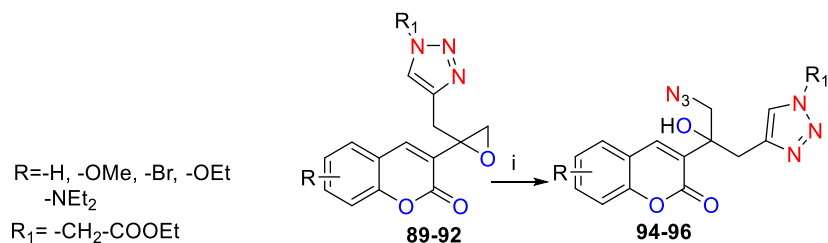


Figura 43. Difracción de Rayos X para la molécula **88**.

Con los resultados mostrados hasta el momento, se aprecia que los derivados correspondientes a EtO- y Et₂N-, no pudieron ser empleados en la ruta de síntesis planteada originalmente, debido a que no se obtuvieron en buenos rendimientos generales de los oxiranos esperados (o simplemente no procedieron como en el caso de Et₂N-). Por lo anterior, se trabajó en la apertura de anillo con el resto de las moléculas, para poder realizar dicho proceso se buscaron las mejores condiciones de reacción.

En la Tabla 25, se muestran rendimientos base pura correspondientes a cada molécula; en lo que respecta a la reactividad, se observa una tendencia general y no se ve afectada por la presencia de un sustituyente electrodonador o electroattractor.

Tabla 25. Rendimientos de la reacción de apertura de anillo usando azida como nucleófilo.^a



Exp.	No.	R	T (°C)	t (h)	%R
1	94	H-			67
2	95	6-MeO-	50	16	70
3	96	6-Br-			70

^a i) KN₃ (1.2 mol), NH₄Cl (1.2 mol), DMF.

El espectro de protón de la molécula de la entrada 2 (molécula **95**) se muestra en la Figura 44, las señales características son el hidrógeno correspondiente al anillo de lactona de la cumarina $\delta=7.9$ ppm, la señal del triazol que sufre un desplazamiento a campo alto $\delta=7.4$ ppm y las señales *dd* correspondientes al metileno base de triazol $\delta=3.5$ ppm con su $J=14$ Hz, y la correspondiente a la base de azida $\delta=3.6$ ppm, mostrando un aumento en su J de 5 Hz a 14 Hz, corroborando la apertura del epóxido.

Se observa que los desplazamientos químicos de las señales del triazol y el metileno base de azida mantienen una similitud entre los derivados obtenidos, dicho resumen se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Desplazamientos químicos (en ppm) de hidrógeno de las señales de triazol y metileno.

Exp.	No.	R	δH (triazol)	$\delta CH_2 N_3$
1	94	H-	7.41	3.67
2	95	6-MeO-	7.19	3.65
3	96	6-Br-	7.19	3.75

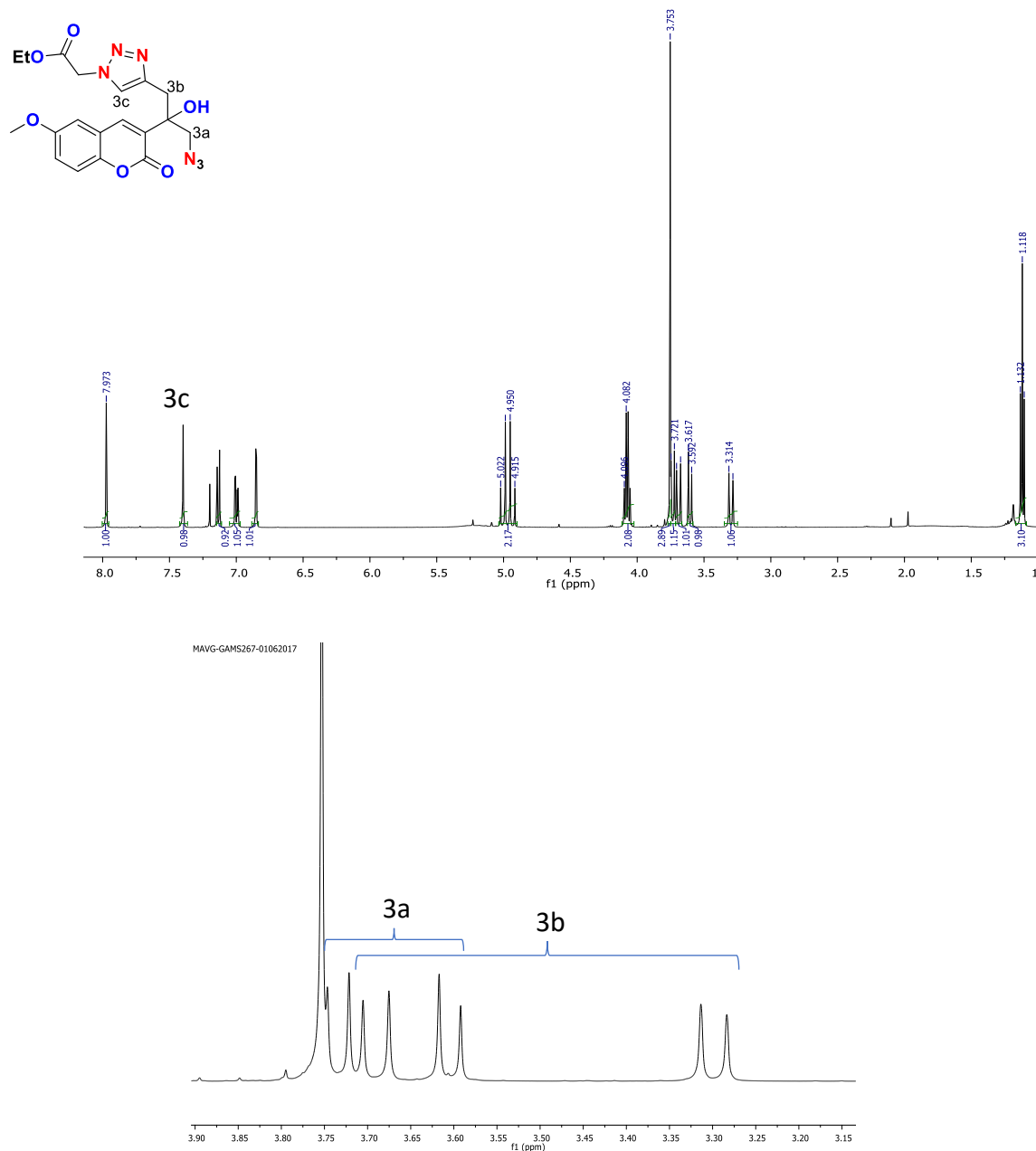


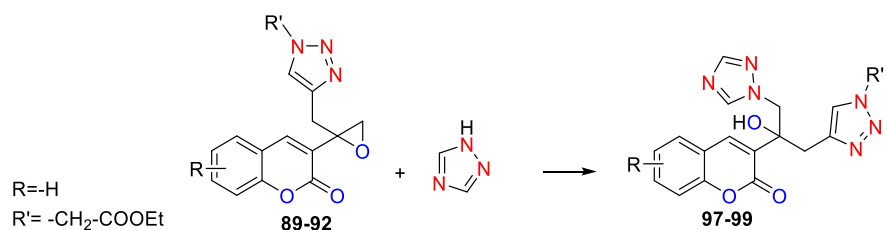
Figura 44. Espectro de RMN-¹H de la molécula **95** en CDCl₃, 500 MHz.

Se buscaron las mejores condiciones de reacción para la apertura del anillo, pero utilizando como nucleófilo el 1H-1,2,4-triazol. Dicha búsqueda se muestra en la Tabla 27. Se aprecia que se necesita como contra ion un catión duro (Li⁺), y permite que el ataque nucleofílico sea realizado por el N1 del triazol puesto que existe evidencia en la bibliografía de que también puede ser llevado a cabo por el N4^{82,83}, pero esto repercute considerablemente en su actividad biológica de forma negativa.

⁸² Shneine, J.; Alaraji, Y.H. *IJSR*, **2016**, *5*, 1411-1423.

⁸³ Parminder, K.; Anshul, C. *Int. Res. J. Pharm.* **2017**, *8*, 10-29.

Tabla 27. Condiciones de reacción para la apertura del oxirano usando 1*H*-1,2,4-triazol.



Exp.	R	T (°C)	Disolvente	Base	Aditivo	Observaciones
1	H	65	DMF	-	NH ₄ Cl	N.R
2		65	DMF	K ₂ CO ₃	-	N.R
3		70	DMF	NaH	-	N.R
4		70	THF	-	NH ₄ Cl	N.R
5		70	THF	K ₂ CO ₃	-	N.R
6						%R= 60%
7	6-MeO-	25	DMF	LiOH	-	%R= 70%
8	6-Br-					%R= 50%

La solubilidad de los compuestos sintetizados es muy baja, por tal motivo se decidió utilizar DMSO como disolvente para su elucidación. En la Figura 45, se muestra un espectro de protón de la molécula correspondiente a la entrada **6** (molécula **97**) y se observan las señales características de la cumarina, pero también se observan dos señales de protones vinílicos en $\delta = 7.83$ ppm y $\delta = 7.95$ ppm, que corresponden a los hidrógenos vinílicos del 1,2,4-triazol, su desplazamiento muestra que efectivamente se llevó a cabo el ataque nucleofílico por parte de N1; se puede observar que el metileno base del 1,2,4-triazol también sufre un desplazamiento a campo bajo por efecto donador del anillo heterocíclico, y se conserva la señal del protón vinílico del 1,2,3-triazol en $\delta = 7.6$ ppm junto con el metileno base del mismo en $\delta = 3.9$ ppm.

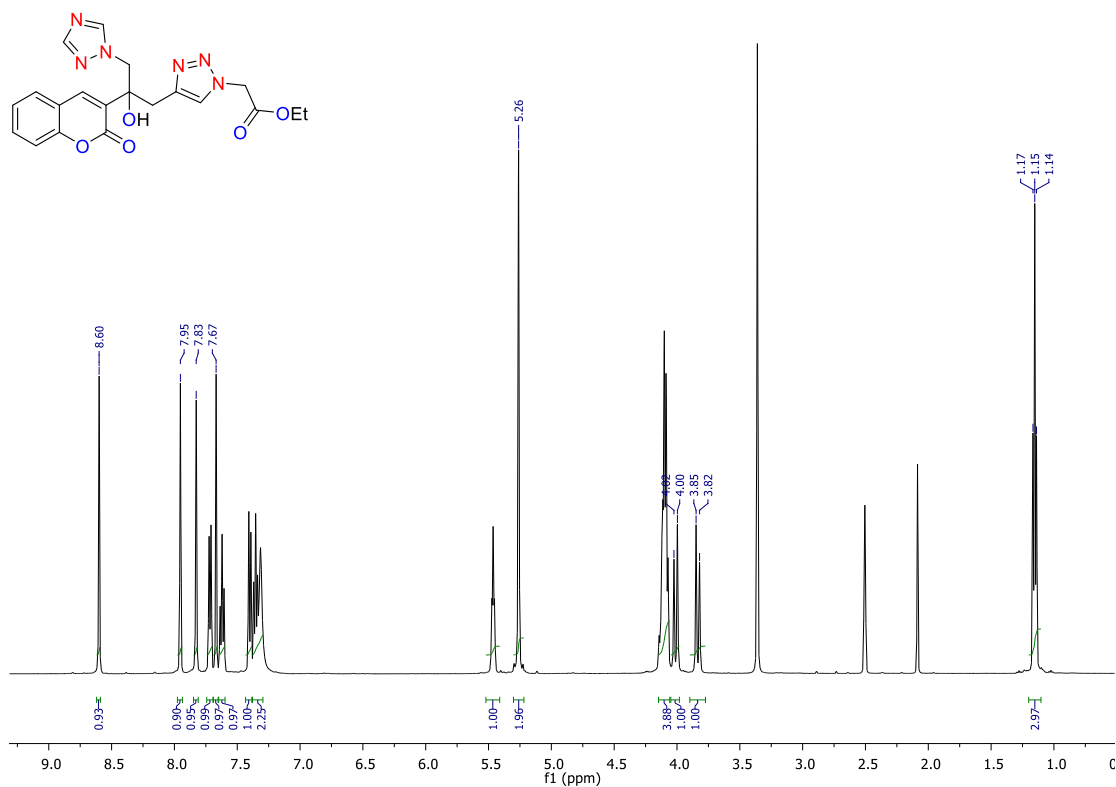


Figura 45. Espectro RMN- ^1H de la molécula **97** en DMSO- d_6 , 500 MHz.

Al igual que en los casos anteriores en la Tabla 28, se hace una comparativa del desplazamiento químico del metileno base de triazol y su constante de acoplamiento. El metileno base de 1,2,4-triazol se encuentra en campo bajo en alrededor de 1 ppm, respecto al metileno base de azida de las moléculas anteriores, esto debido al efecto electrónico que da el anillo de 5 miembros al metileno, en comparación con sustituyente azida. Se observa que también existe un ligero cambio en la J de acoplamiento del metileno, estos parámetros a pesar de ser distintivos no son muy útiles al momento de caracterizar las estructuras, se prefiere IR para distinguir entre azida y 1,2,4-triazol, además de que el espectro de RMN- ^{13}C otorga desplazamientos más notables entre los metilenos.

Tabla 28. Desplazamiento químico y constante de acoplamiento del metileno base de 1,2,4-triazol.

Exp. No.	R	1,2,4-triazol	
		δ ppm	J (Hz)
1	97 H-	4.38	11.8
2	98 6-MeO-	4.43	12.1
3	99 6-Br-	4.47	11.9

En la Figura 46, se realizó una comparativa de los espectros IR de los intermediarios de una familia de cumarinas (6-Br) con la ruta de síntesis planteada. Se puede observar que se mantiene un solo carbonilo alrededor de 1700 cm^{-1} correspondiente al anillo de lactona del heterociclo de cumarina; la parte importante para corroborar el avance de la reacción es la desaparición de la señal del hidroxilo en 3477 cm^{-1} (color negro) para convertirse en oxirano y desplazar la señal del alquino terminal a 3200 cm^{-1} (naranja), esta señal desaparece como se espera debido a la cicloadición con la azida orgánica (azul), para después presentar de nuevo las bandas correspondientes al hidroxilo terciario 3400 cm^{-1} y a la azida 2100 cm^{-1} (verde), en este espectro también se alcanza a identificar la nueva señal del carbonilo de éster proveniente de la azida orgánica; y por último, en el caso de los bitriazoles, se observa una banda del hidroxilo muy ancha, y además las bandas estiramiento N=N, junto con las bandas de los carbonilos donde se pueden observar valores semejantes. En la Tabla 29 se hace una comparación de los desplazamientos de las bandas principales de los derivados sintetizados, que corresponden a los desplazamientos reportados en la literatura de los grupos funcionales, se puede observar que la intensidad de las bandas es variable para cada molécula, pero no dejan de estar en los intervalos correspondientes.

Tabla 29. Desplazamiento en cm^{-1} de las bandas de los principales grupos funcionales.

Molécula	Alquino ($\text{C}\equiv\text{C-H}$)	Carbonilo Éster cíclico	Carbonilo Triazol- éster	Azida - N_3	1,2,3- triazol	1,2,4- triazol
77	3274	1707	-	-	-	-
78	3303	1676	-	-	-	-
79	2974	1708	-	-	-	-
80	3307	1690	-	-	-	-
81	3310	1699	-	-	-	-
82	3265	1714	-	-	-	-
83	3256	1699	-	-	-	-
84	3258	1725	-	-	-	-
85	3282	1743	-	-	-	-
86	2972	1718	-	-	-	-
87	-	1754	1713	-	1631-1611	-
88	-	1750	1711	-	1580	-
89	-	1730	1725	-	1627-1602	-
92	-	1753	1693	2098	1609-1571	-
93	-	1753	1692	2101	1625-1590	-
94	-	1748	1703	2107	1602-1563	-
95	-	1750	1705	-	1629-1611	1506-1456
96	-	1751	1692	-	1578	1497
97	-	1749	1715	-	1601-1566	1505-1479

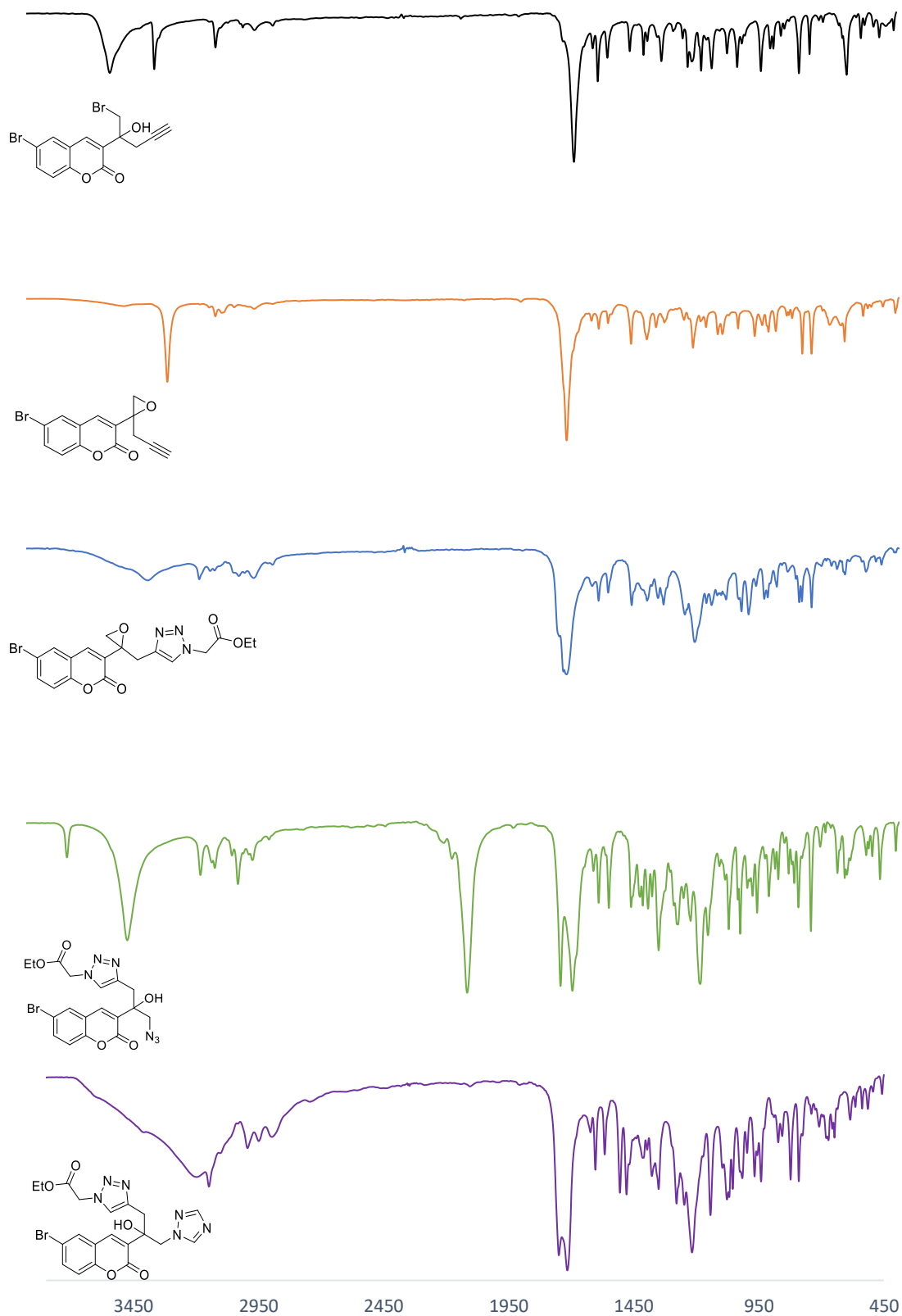


Figura 46. Espectros IR de la familia de cumarinas con sustituyente bromo, de la ruta de síntesis planteada.

Para obtener los espectros de UV, se utilizó MeOH como disolvente a la misma concentración, dicha concentración es de 10^{-6} M, esta concentración fue seleccionada porque permitía observar las bandas de absorción perfectamente distinguibles, en la Figura 47 se hace la comparación de los espectros de absorción para la familia de cumarinas con sustituyente (6-MeO-) de toda la ruta de síntesis planteada; siendo la especie de: Alquino con Bromo (**78**), Epóxido (**83**), Epóxido-Triazol (**90**), Azida-triazol (**95**), Bi-triazol (**98**). Se puede observar, que no existe un desplazamiento significativo entre especies, y es el mismo caso para todas las moléculas obtenidas. Para el caso de la familia con el sustituyente previamente mencionado se observan dos bandas representativas, una en 280 nm y otra en 350 nm aproximadamente, la primera corresponde a la absorción del sistema aromático de la cumarina (del tipo $\pi-\pi^*$) y la segunda se debe a la conjugación otorgada por el sustituyente (del tipo $n-\pi^*$).

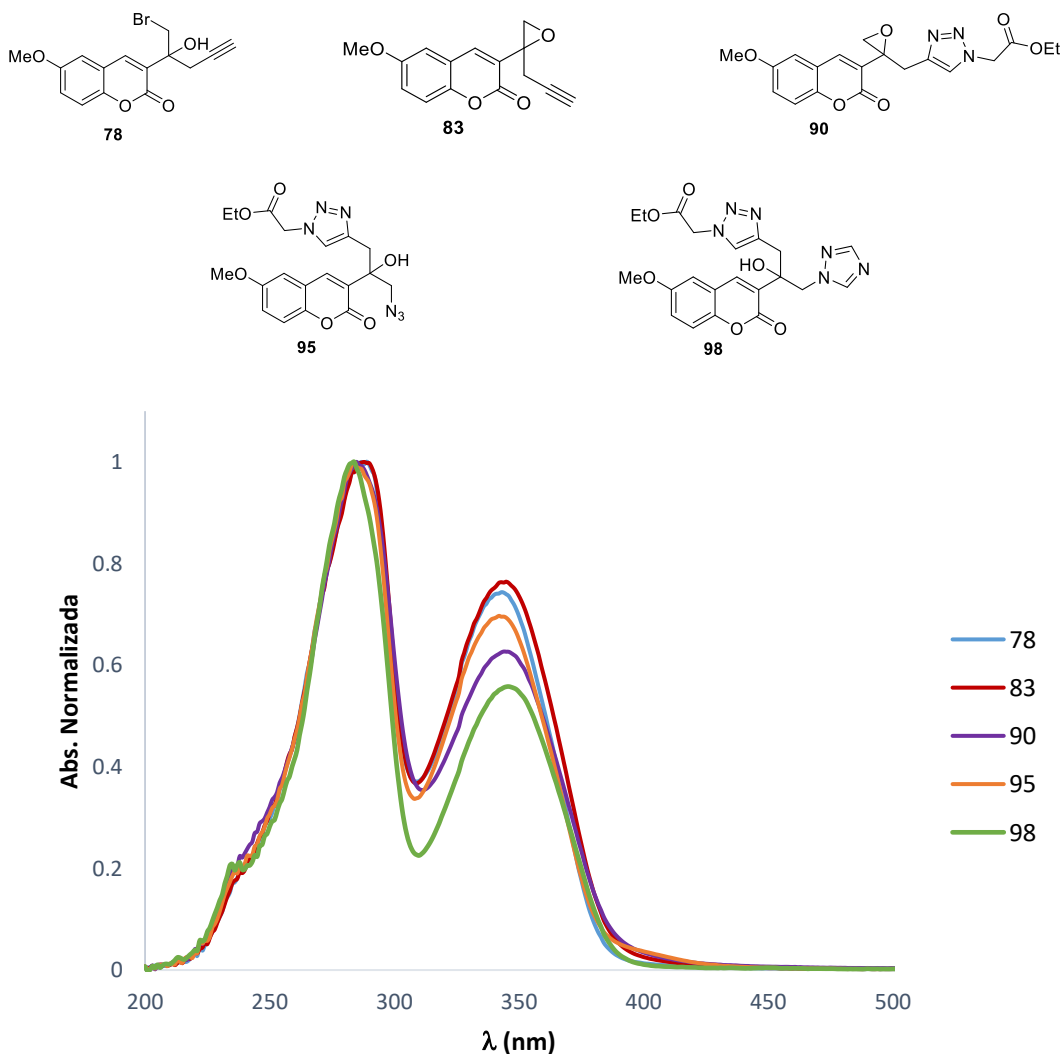


Figura 47. Traslape de espectros UV de la familia de cumarinas con sustituyente metoxilo en MeOH 10^{-6} M.

2.6.3 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó frente a las cepas ATCC10231 (*C. albicans* sensible), ATCC14423 (*C. krusei* resistente, cepa control), CBS138 (*C. glabrata* sensible), CGL43 (*C. glabrata* resistente), ATCC22019 (*C. parapsilosis* sensible, cepa control).

Los compuestos fueron disueltos en DMSO y se evaluaron en concentraciones de 0.5-300 µg/mL se realizaron las diluciones seriadas de cada una a partir de una concentración inicial (10^{-2} M); el DMSO fue utilizado como blanco. El ensayo se realizó en placas de Elisa donde se expusieron las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de los compuestos **94-96** y **97-99**, y una vez finalizado el tiempo de exposición se realizó la medición de la densidad óptica a tiempos de 0 h, hasta 24 h de contacto, con la finalidad de conocer el crecimiento del microorganismo pasado dicho periodo. En las siguientes gráficas se realiza la comparativa entre el porcentaje de crecimiento absoluto frente la concentración del compuesto.

Los resultados muestran que no hubo efecto representativo en la inhibición del crecimiento, inclusive en las cepas sensibles usadas como control, cabe mencionar que a concentraciones muy altas (a partir de los 75 mg/mL) se comienza a ver que existe inhibición para *C. kuresei* resistente con todas las muestras, pero no es un resultado de relevancia porque la cantidad con la que se empieza a ver este efecto, es elevada y no es comparable con las reportadas en la literatura. En la Figura 48, se muestran las gráficas para las moléculas que tuvieron mejor actividad biológica.

Cabe mencionar que la molécula que presentó mejor actividad biológica fue aquella con el grupo azida y el sustituyente Br- en el anillo aromático, esto concuerda con la información *docking* proporcionada. En general las moléculas con mayor actividad inhibitoria son las que poseen un grupo azida y el 1,2,3-triazol. Pero de nueva cuenta, la concentración utilizada es demasiado alta en comparación con la reportada en la literatura para compuestos con triazoles⁸⁴. Estos valores elevados pueden ser debido a la metodología de evaluación aplicada, es empíricamente conocido que dependiendo del método (diluciones seriadas, inhibición en placa, etc.) el valor de la CMI puede cambiar.

Al presentar valores tan altos de concentración y tener tan poco efecto, inclusive en las cepas sensibles, la evaluación biológica concluyó con la cuantificación de la inhibición de crecimiento, y no se procedió a realizar otros parámetros como la cuantificación de ergosterol, la medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la IC₅₀.

⁸⁴ Genin, M. J.; Allwine, D.A.; Anderson, D.J.; Barbachyn, M. R.; Emmert, D.E.; Stuart, A.; Garmon, D. R.; Graber, K. C.; Grega, J. B.; Hester D.K.; Hutchinson, J.; Morris, R.J.; Reischer, C. W.; Ford, G. E.; Zurenko, J. C.; Hamel, R. D.; Schaad, D.; Stapert, B.; Yagi, H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 953-970.

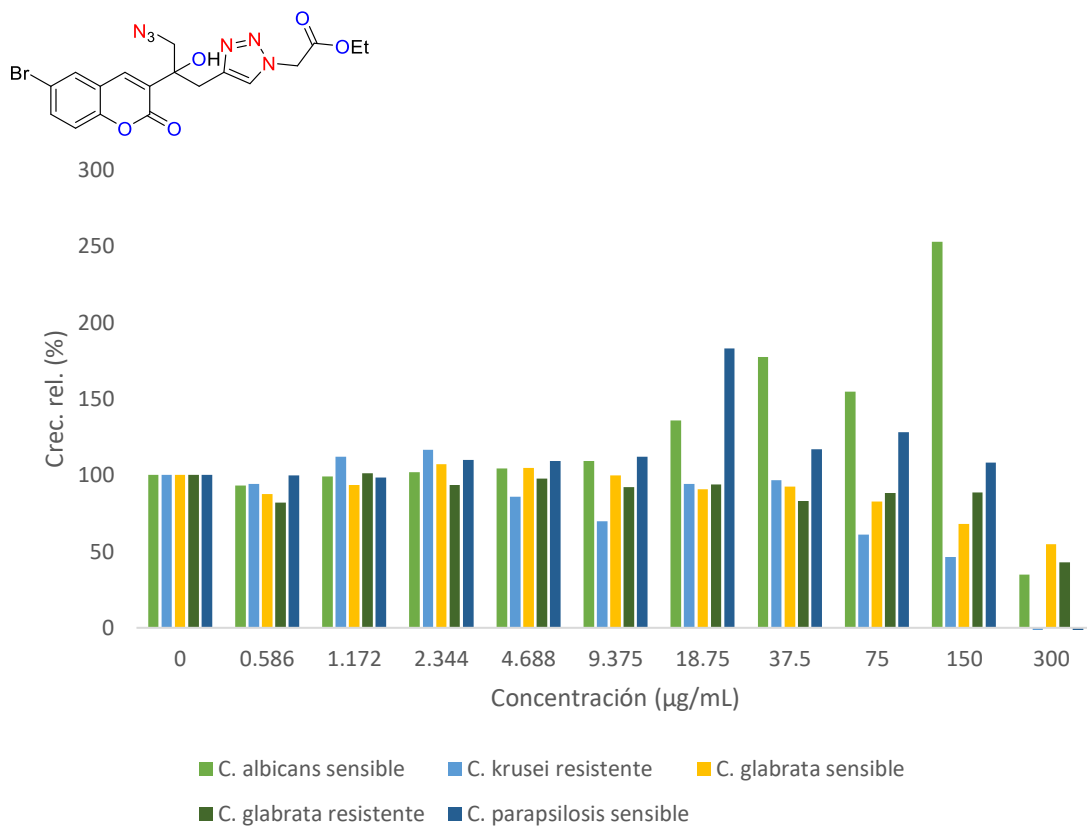
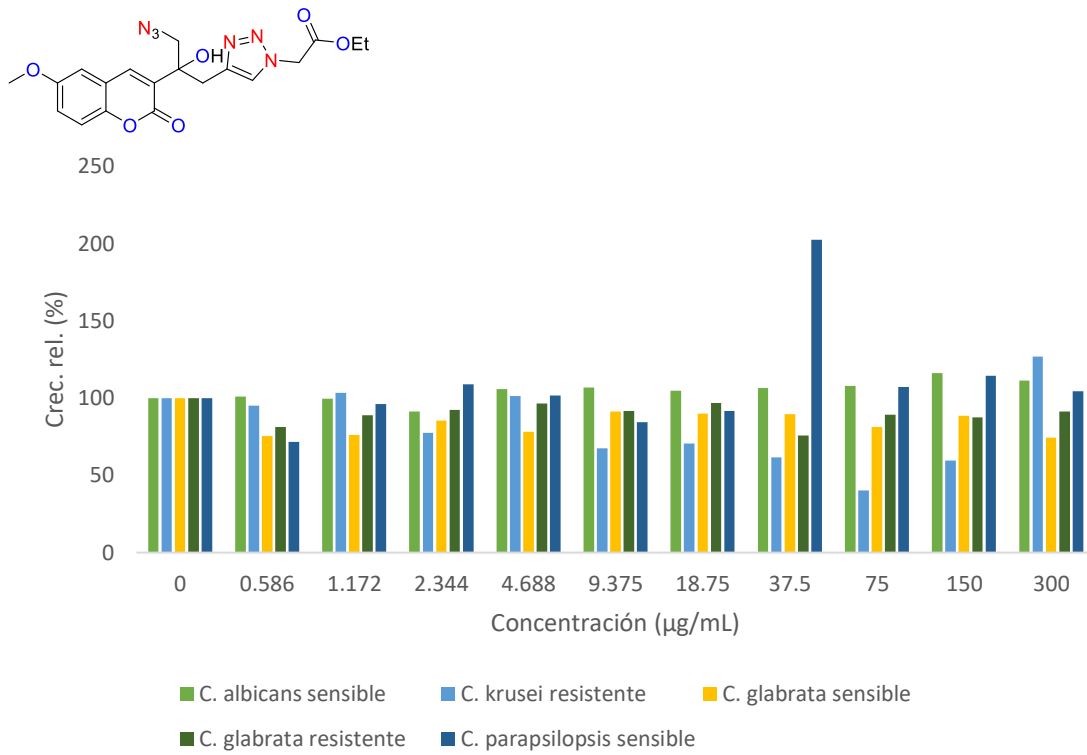


Figura 48. Gráficas de inhibición de crecimiento celular para las moléculas que tuvieron mejor actividad biológica **95** y **96**.

2.7 CONCLUSIONES

Se sintetizaron 3 análogos de fluconazol y 3 moléculas de azida-triazol con base de núcleo cumarina en rendimientos moderados, 50-70% y 60-70% respectivamente, siendo un total de 6 moléculas con potencial actividad antifúngica. Durante la síntesis de dichos compuestos se obtuvieron diferentes estructuras cristalográficas que nos corroboran las estructuras propuestas. La caracterización mediante UV nos permite observar que las familias con sustituyente 6-MeO-, 7-Et₂N- presentan emisión en el espectro visible y tienen potencial aplicación como sondas fluorescentes.

De acuerdo al estudio *docking*, los compuestos con sustituyente Br-, siendo bitriazol o azida-triazol pueden presentar mejor actividad antifúngica, mientras que, los estudios de la actividad biológica mostraron que esto es solo a concentraciones elevadas (300 µg/mL). También se corroboró que existe diferencia en la potencia respecto a tener una estructura con azida o con 1,2,4-triazol.

Por otra parte, durante la realización del proyecto se obtuvieron moléculas diferentes para los sustituyentes de Et₂N- y EtO- (el alcohol primario **86** y el aleno **87**, respectivamente), para estos casos aislados falta realizar diferentes pruebas de reactividad que corroboren los mecanismos propuestos, así como estudiar un posible campo de aplicación de las estructuras sintetizadas que no corresponden a la ruta de síntesis.

CAPITULO III

MATERIALES FLUORESCENTES

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Flavaglinas

También llamadas rocaglamidas o rocaglatos, son una familia de compuestos de ciclopenta[*b*]benzofuranos que se aíslan únicamente de plantas del género *Aglaia*. Se tienen registros del uso de estas plantas en la medicina tradicional para el tratamiento del asma y enfermedades de la piel⁸⁵. La rocaglamida (Figura 49), fue el primer compuesto aislado y caracterizado de esta familia, debido a su potente actividad antileucémica⁸⁶.

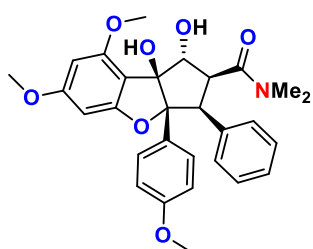


Figura 49. Estructura de la rocaglamida.

A partir de entonces, se tienen caracterizados más de 100 diferentes compuestos de esta familia, y han atraído la atención de científicos por su amplio espectro de bioactividades que incluyen desde insecticidas, antifúngicos, antiinflamatorios, neuroprotectores, cardioprotectores, y con particular atención, anticancerígenos⁸⁷. Desde el punto de vista estructural, los químicos orgánicos se mantienen interesados debido a su complejidad y por su estructura altamente funcionalizada y tensionada. La característica más intrigante de las flavaglinas es la citotoxicidad selectiva hacia las células cancerosas⁸⁸. De hecho, hasta donde sabemos, todas las líneas celulares de cáncer y las líneas celulares transformadas son sensibles a esta citotoxicidad, mientras que los cultivos primarios de células no cancerosas no se ven afectados⁸⁹.

Actualmente también se han sintetizado diferentes análogos, todos han demostrado potencia frente a líneas celulares de cáncer, en la Figura 50 se muestran algunos ejemplos. Para comprobar y estudiar los mecanismos de acción, se reportó la síntesis de un análogo de rocaglamida unido a una estructura de cumarina (Figura 50, recuadro verde), esta última al presentar propiedades fluorescentes, se utilizó pensando que se podría “rastrear” a la molécula en el interior de la célula. En primera instancia pareció funcionar, pues se rastreó hasta el retículo

⁸⁵ Baumann, B.; Bohnenstengel, F.; Siegmund, D.; Wajant, H.; Weber, C.; Herr, I.; Debatin, K.-M.; Proksch, P.; Wirt, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44791-44800.

⁸⁶ King, M.L.; Chiang, C.-C.; Ling, H.-C.; Fujita, E.; Ochiai, M.; McPhail, A.T. *Chem. Commun.* **1982**, *20*, 1150-1151.

⁸⁷ Ribeiro, N.; Thuaud, F.; Nebigil, C.; Désaubry, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1857-1864.

⁸⁸ King, M.L.; Chiang, C.-C.; Ling, H.-C.; Fujita, E.; Ochiai, M.; McPhail, A.T. *Chem. Commun.* **1982**, *20*, 1150-1151.

⁸⁹ Basmadjian, C.; Thuaud, F.; Ribeiro, N.; Désaubry, L. *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 2185-2197.

endoplasmático⁹⁰, sugiriendo un tipo de mecanismo de acción, pero surgió la duda sobre si fue la rocaglamida la que se posicionó ahí, o la cumarina fue la que dirigió dicha localización. Por estos motivos aún quedan elusivos los procesos de actividad biológica.

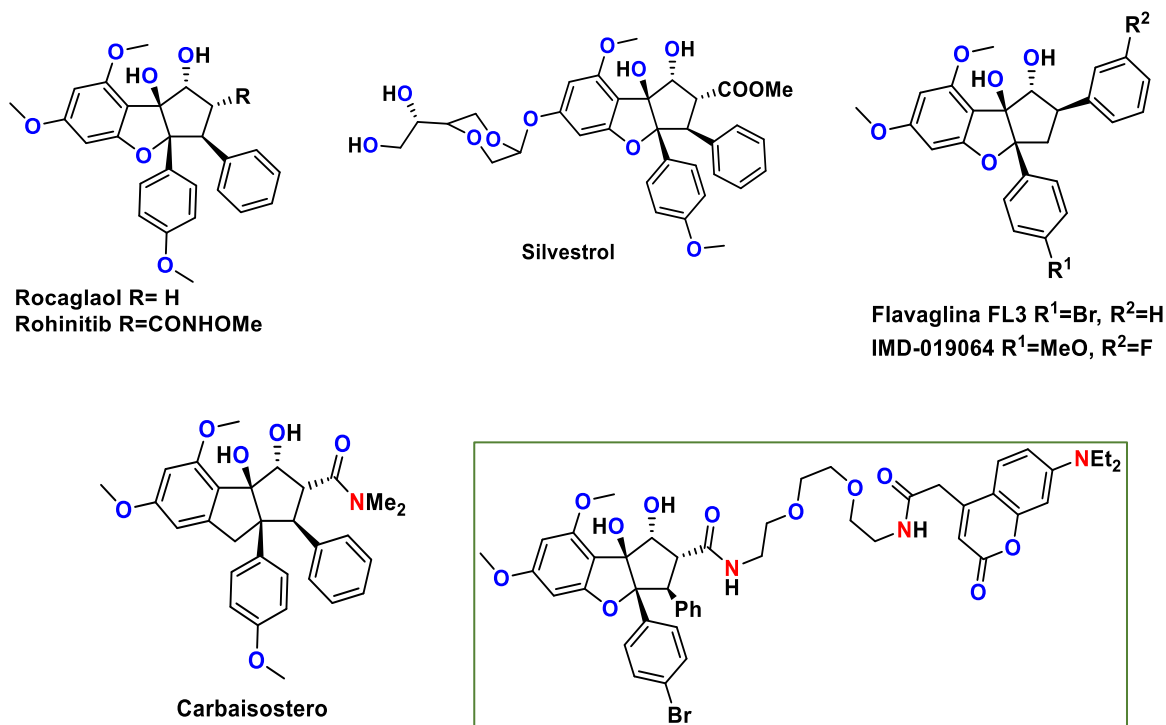


Figura 50. Ejemplos de análogos de flavaglinas sintetizados.

Resulta importante conocer exactamente el mecanismo de acción de las moléculas bioactivas, para ello, el uso de la fluorescencia es indiscutiblemente útil tanto por sencillez como rapidez, el hecho de que alguna molécula de flavaglina mostrara fluorescencia por sí misma, es un área de oportunidad para desarrollar una síntesis.

3.1.2 Materiales fluorescentes

En los últimos 70 años, la fluorescencia ha evolucionado de una curiosidad científica a una herramienta indispensable para examinar fenómenos biológicos. Hoy en día, las moléculas fluorescentes se utilizan ampliamente como marcadores para biomoléculas, sustratos para enzimas, indicadores para iones y manchas para dominios subcelulares. Las moléculas orgánicas pequeñas constituyen una subclase importante de fluoróforos útiles, e innumerables sondas de moléculas pequeñas están disponibles comercialmente o mediante diseño y síntesis *de novo*. La unión de diferentes grupos reactivos, variedades de sustrato, agentes quelantes y

⁹⁰ Thuaud, F.; Bernard, Y.; Turkeri, G.; Dirr, R.; Aubert, G.; Cresteil, T.; Baguet, A.; Tomasetto, C.; Svitkin, Y.; Sonenberg, N.; Nebigil, C. G.; Désaubry, L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5176-5187.

otras funcionalidades químicas a un conjunto bastante pequeño de soportes colorantes da lugar a la gran colección de sondas fluorescentes disponibles en la actualidad. La Figura 51, muestra algunos de los colorantes fluorescentes con átomos de oxígeno, utilizados como marcadores de procesos o simplemente colorantes^{91,92,93}.

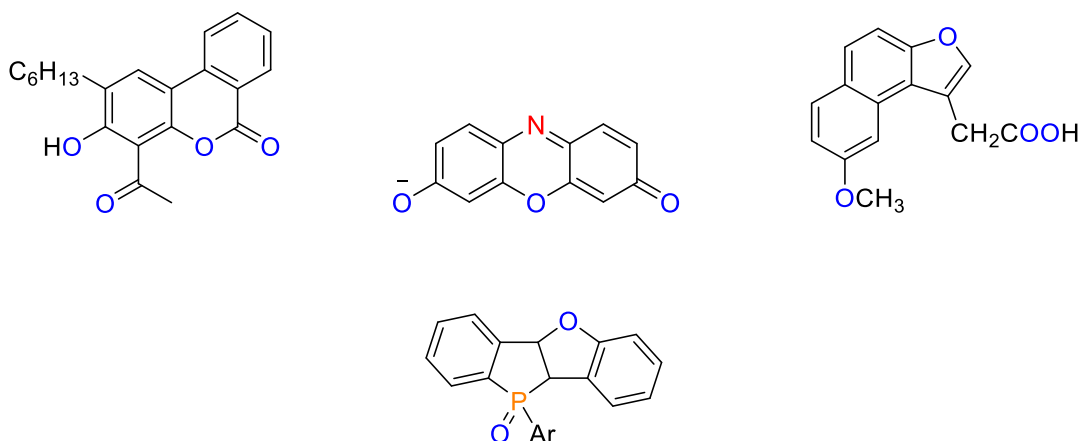


Figura 51. Fluoróforos comunes con átomos de oxígeno.

A su vez, existen otro tipo de compuestos, los cuales se coordinan a un ácido de Lewis para poder mejorar significativamente sus propiedades luminiscentes, estos son los compuestos de organoboro, los cuales han sido extensamente explotados en años recientes debido a sus propiedades luminiscentes que han encontrado aplicación en muchos campos de investigación⁹⁴. Los compuestos como los que se muestran en la Figura 52 tienen aplicaciones generalizadas, por ejemplo, en quimiosensores⁹⁵, marcaje biomolecular⁹⁶ y terapia fotodinámica⁹⁷. Investigaciones recientes también han descrito el uso de estas estructuras como sondas de vida de fluorescencia para interacciones con el ADN⁹⁸.

⁹¹ Deperasińska, I.; Makarewicz, A.; Krzeszewski, M.; Gryko, D.T. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *11*, 9051-9058.

⁹² Goncalves, M. S. T. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190-212.

⁹³ Takashi, M.; Nakano, K.; Nozaki, K. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3790-3797.

⁹⁴ Kumbhar, H.S.; Deshpande, S.S.; Shankarling, G.S. *Dyes and Pigments*, **2016**, *127*, 161-169.; Potopnyk, M.A.; Volyniuk, D.; Ceborska, M.; Cmoch, P.; Hladka, I.; Danyliv, Y.; Grazulevicius, J.V. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12129-12142.; Bonaccorso, H. G.; Martins, M. A. *New J. Chem.*, **2018**, *42*, 1913-1920.

⁹⁵ Okutan, E.; Tumay, S. O.; Yesilot, S. *J. Fluoresc.*, **2016**, *6*, 2333-2343.

⁹⁶ Martynov, V. I.; Pakhomov, A. A.; Popova, N. V.; Deyev, I. E.; Petrenko, A. G. *Acta Nat.*, **2016**, *4*, 33-46.

⁹⁷ Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chungc, L. Y.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *1*, 77-88.

⁹⁸ Dziuba, D.; Jurkiewicz, P.; Cebecauer, M.; Hof, M.; Hocek, M. *Angew. Chem.*, **2016**, *55*, 174-178.

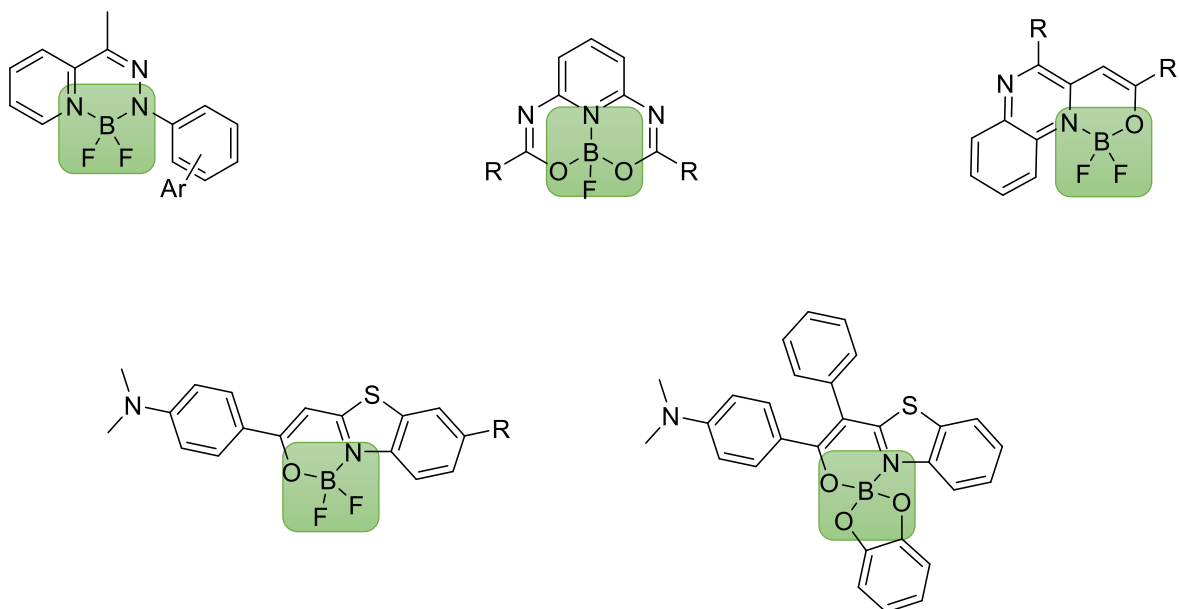


Figura 52. Moléculas de organoboro con propiedades fluorescentes.

En resumen, en este capítulo se aborda el diseño de nuevos componentes orgánicos con potencial actividad fluorescente, a partir de núcleos con actividad biológica registrada. El propósito de este apartado es la síntesis de moléculas base de flavaglina y oxaziborinina.

3.2 JUSTIFICACIÓN

Resulta importante conocer la localización celular de las diferentes estructuras que pretendan tener actividad biológica, para ello los estudios de fluorescencia son herramientas muy útiles; el problema radica en la dificultad de sintetizar moléculas que no presenten autoextinción, o tengan diferente longitud de emisión a las estructuras celulares.

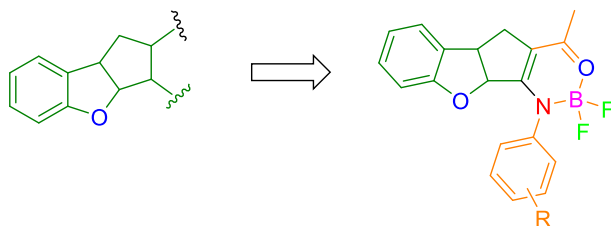
Se pretende funcionalizar estructuras de posible actividad biológica, de tal manera que puedan lograr fluorescencia.

3.3 HIPÓTESIS

Las moléculas sintetizadas presentarán propiedades fluorescentes, y serán útiles para poder analizarse en el interior de líneas celulares. Al poseer desplazamientos de Stokes diferentes, no interferirán con las mediciones de emisión de fluorescencia propias de proteínas. Por último, además de llegar al interior de la célula presentarán actividad biológica propia del núcleo principal de flavaglina.

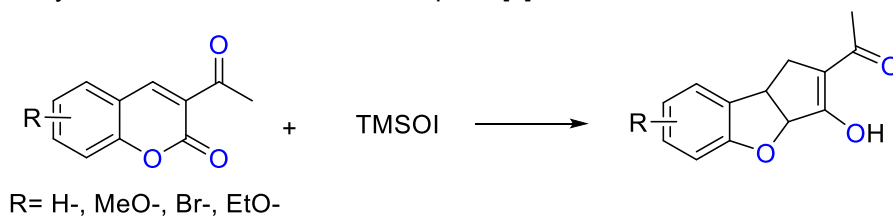
3.4 OBJETIVO GENERAL

Construir plataformas orgánicas derivadas de rocaglamida, con posible aplicación fluorescente.

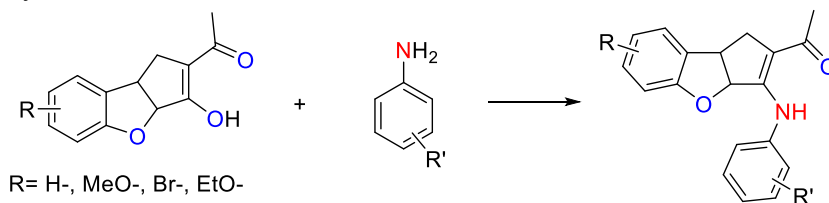


3.5 OBJETIVOS ESPECIFICOS

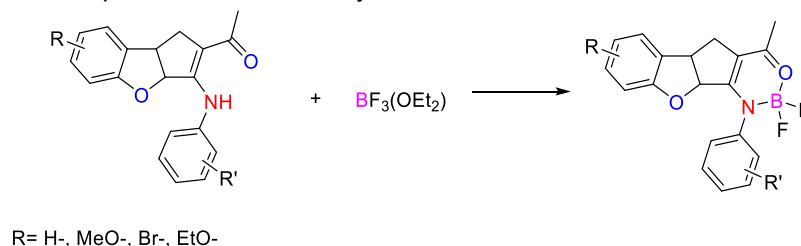
- Sintetizar y caracterizar derivados de ciclopenta[*b*]benzofuranos.



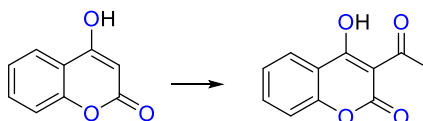
- Sintetizar y caracterizar las enaminas.



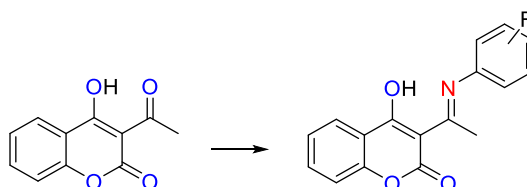
- Sintetizar los compuestos coordinados y realizar su caracterización.



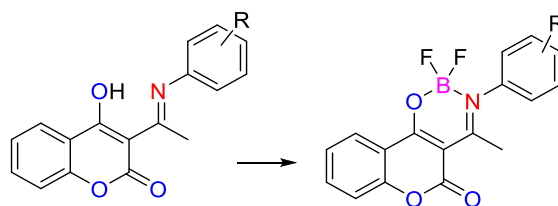
- Sintetizar y caracterizar plataformas de 4-hidroxicumarina acetiladas.



- Sintetizar iminas y realizar su caracterización.



- Sintetizar y caracterizar los compuestos coordinados con núcleo de cumarina.

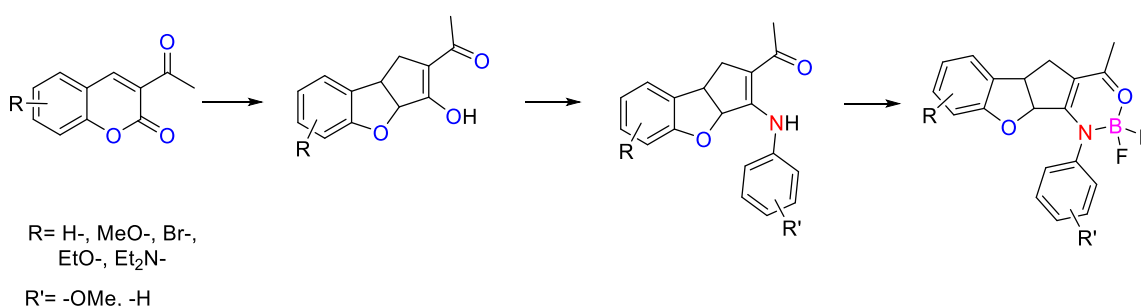


- Evaluar las propiedades fluorescentes de los compuestos obtenidos.

3.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.6.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

La síntesis de las estructuras objetivo comienza con una transformación de apertura de anillo, a partir de 3-acetilcumarinas usando TMSOI, en el esquema 4 se muestra de manera general la ruta de síntesis planteada.

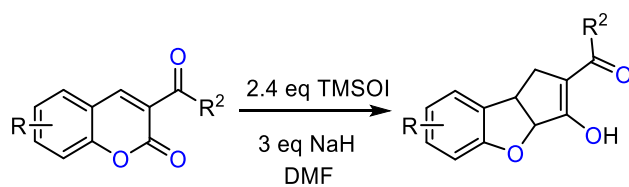


Esquema 4. Ruta de síntesis planteada para la obtención de las oxazaborininas.

Para llevar a cabo la síntesis de las estructuras base, se aplicó la metodología reportada por Yamashita *et al.*⁹⁹ usando los núcleos de 3-acetilcumarinas previamente sintetizados por el grupo de investigación, en esta metodología se hace reaccionar TMSOI con NaH en un disolvente polar aprótico anhidro, en la referencia se hace énfasis en el uso de DMSO, pero al probar con nuestras moléculas la presencia de hidrógenos ácidos en los acetilos en posición 3 de la cumarina, hacían que los rendimientos bajarán considerablemente, y se escogió trabajar con DMF y con esto se prefiere la formación adecuada del reactivo alquilante, a continuación se adicionó la cumarina a temperatura ambiente aumentando los rendimientos base pura de las moléculas esperadas. Finalmente, se adicionó ácido clorhídrico diluido y posterior neutralización con bicarbonato de sodio para obtener los ciclopenta[*b*]benzofuranos correspondientes (Tabla 30).

⁹⁹ Yamashita, M.; Okuyama, K.; Kawajiri, T.; Takada, A.; Inagaki, Y.; Nakano, H.; Tomiyama, M.; Ohnaka, A.; Terayama, I.; Kawasaki, I.; Ohta, S. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 1497-1505.

Tabla 30. Rendimientos de reacción para las moléculas obtenidas.



Exp.	No.	R	R ²	%R
1	100	H-		50
2	101	6-MeO-		61
3	104	8-EtO-	-CH ₃	45
4	102	6-Br-		35
5	103	7-Et ₂ N-		40

El mecanismo de reacción mediante el cual ocurre esta transformación se detalla en la Figura 53, este mecanismo es reportado por Yamashita y explica la apertura del anillo de lactona con su posterior ciclación a benzofurano. Por otro lado, en la Figura 54 se observa un espectro de hidrógeno de Resonancia Magnética Nuclear, se etiquetan las señales más importantes que corresponden a los hidrógenos alifáticos de los anillos fusionados en la Tabla 31, se enlistan los desplazamientos en RMN-¹H de los derivados de rocaglamida.

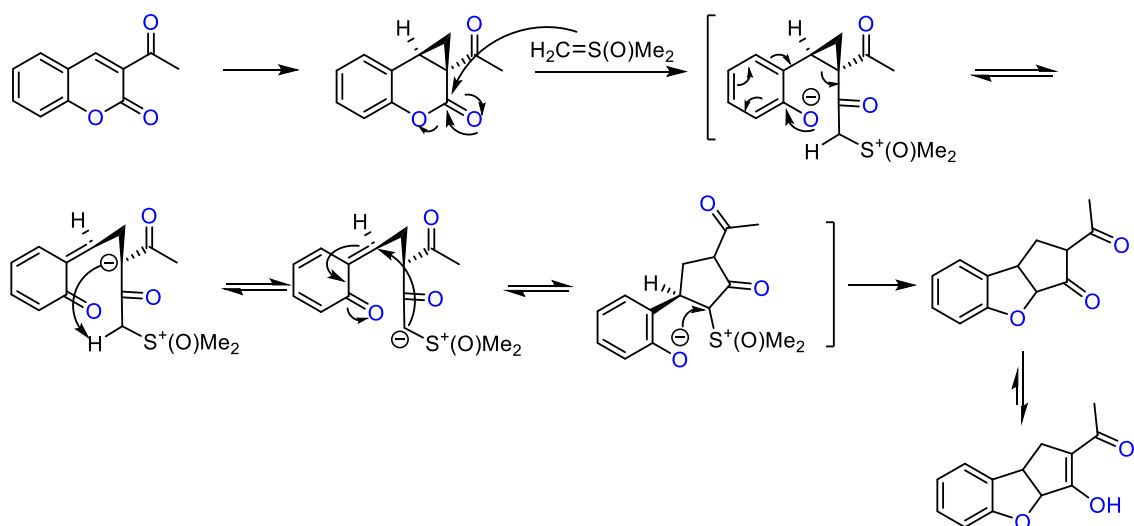


Figura 53. Mecanismo de reacción para la formación de ciclopenta[*b*]benzofuranos.

Tabla 31. Desplazamientos de RMN-¹H de los derivados de rocaglamida.

Molécula	H-2	H-4	H-5	H-3a
100	5.54	3.17, 2.77	4.09	2.11
101	5.51	3.15, 2.75	4.07	2.14
102	5.55	3.16, 2.73	4.07	2.15
103	5.49	3.07, 2.67	3.98	2.08

104 5.58 3.14, 2.74 4.01 2.14

A la par se comenzó a trabajar en la ruta de síntesis para utilizar 4-hidroxicumarinas y obtener otro tipo de compuestos (Esquema 5).

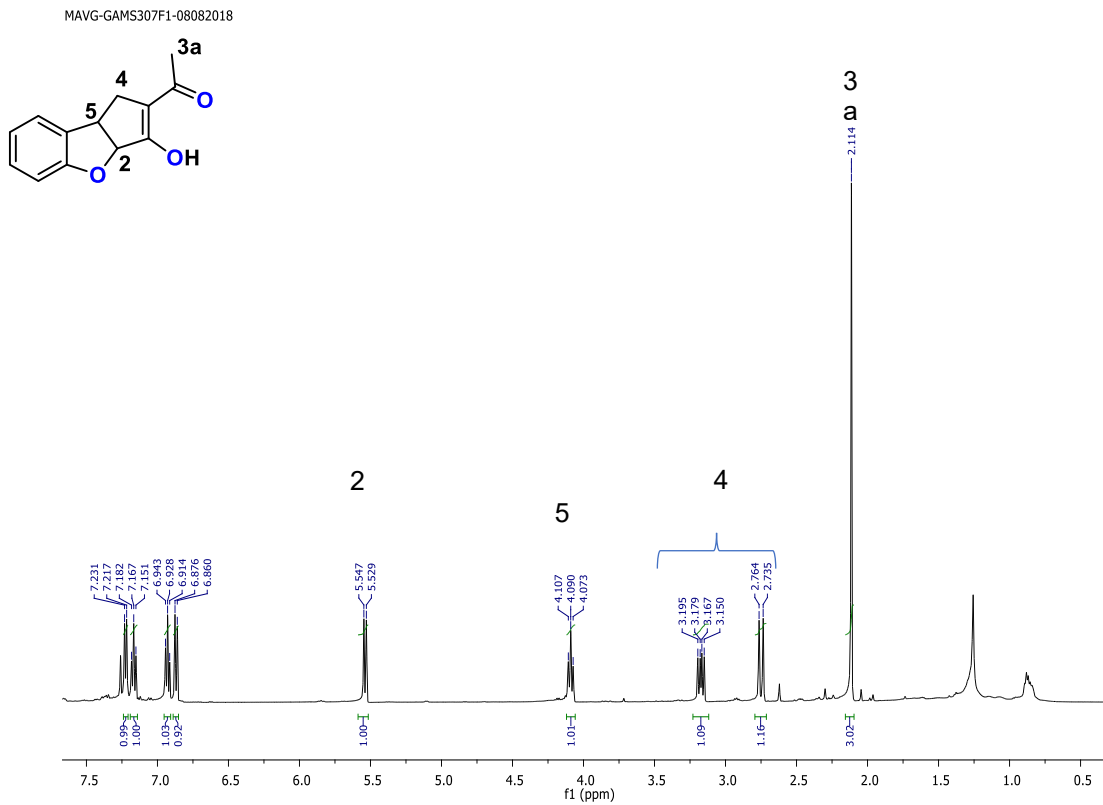
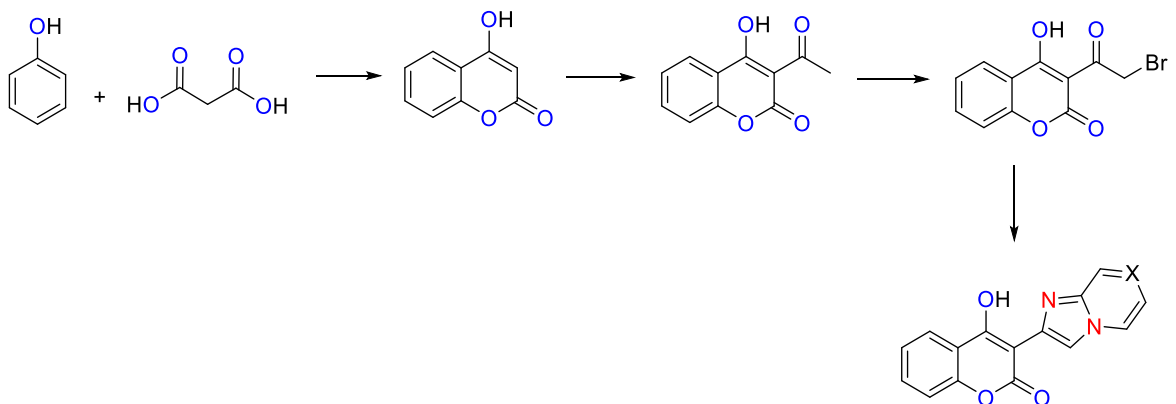


Figura 54. Espectro RMN-¹H del compuesto **100** en CDCl₃, 500 MHz.



Esquema 5. Ruta de síntesis planteada para la obtención de plataformas de cumarina.

Para comenzar, se sintetizó la 4-hidroxicumarina mediante la metodología establecida por Naveen *et al.*¹⁰⁰ utilizando fenol como material de partida, la Figura 55 muestra el espectro de hidrógeno de la cumarina obtenida, así como los subproductos que se aislaron y caracterizaron. Se observan las señales características de la 4-hidroxicumarina, un protón correspondiente en 6 ppm que corresponde al hidrógeno en posición 3, el cual se diferencia del precursor antes de la ciclación en el espectro color verde, el protón vinílico muestra un desplazamiento a campo bajo debido al efecto del hidroxilo, por último, se observa en azul el espectro de un subproducto donde ocurre una sustitución nucleofílica aromática en el hidróxilo por una molécula de etanol, mostrando los correspondientes triplete y cuadruplete además de la señal del H-3 en 6 ppm.

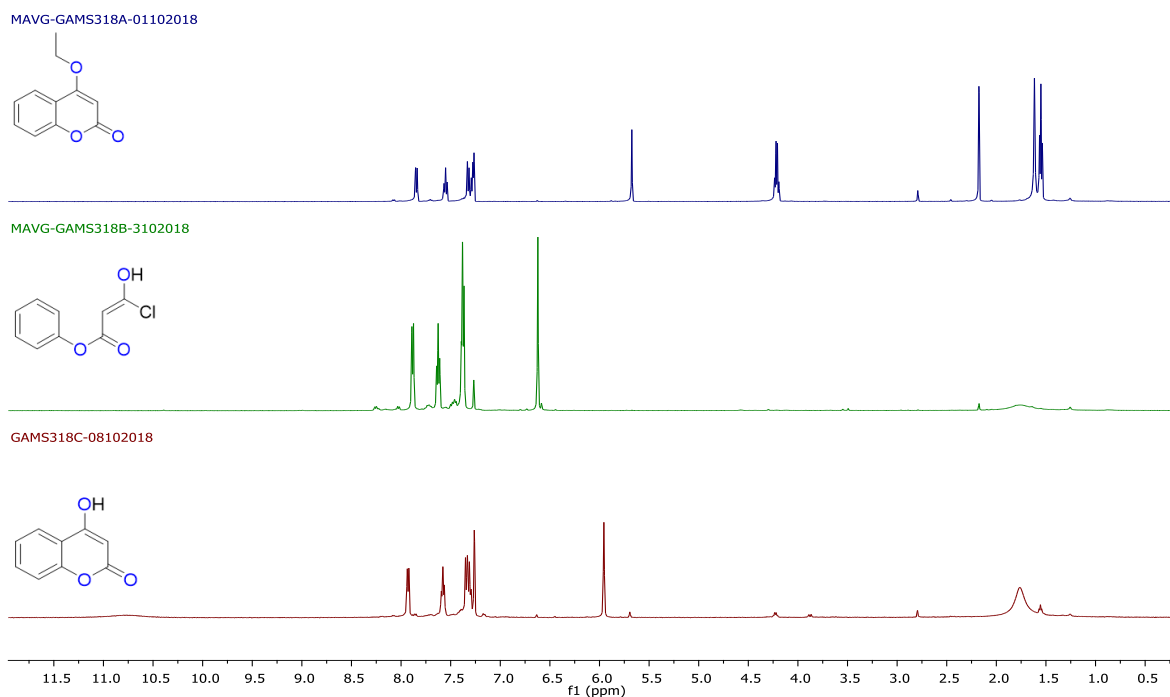


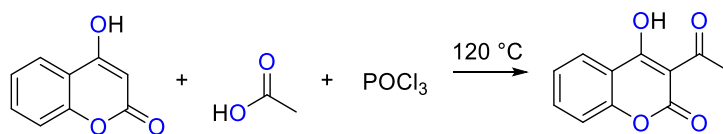
Figura 55. Comparación de espectros RMN-¹H del compuesto deseado y los subproductos.

Una vez pura y caracterizada, la cumarina fue utilizada como material de partida para realizar acetilación en la posición 3 de la misma usando la metodología reportada por Hamdi *et al.*¹⁰¹. En la Figura 56 se muestra el espectro de hidrógeno de la 3-acetil-4-hidroxicumarina, se observa que desaparece el H-3 del precursor y en su lugar se observa la señal del metilo del sustituyente acetil, conservando las señales del anillo aromático.

Para realizar la halogenación, se intentaron procedimientos reportados previamente en la bibliografía, pero no se tuvo éxito con ninguna, motivo por el cual se modificó la ruta de síntesis como se ejemplifica en el Esquema 16. Usando el carbonilo como sustrato para la síntesis de iminas aromáticas, y por último realizar una coordinación que permita una conjugación completa del sistema.

¹⁰⁰ Naveen, S.; Adlakha, P.; Upadhyay, K.; Shah, A.; Anandalwar, S. M.; Prasad, J. S. *X-Ray Struct. Anal. Online*. **2006**, *22*, 103-104.

¹⁰¹ Al-Ayed, A. S.; Hamdi, N. *Molecules*, **2014**, *19*, 911-924.



MAVG-GAMS321-15102018

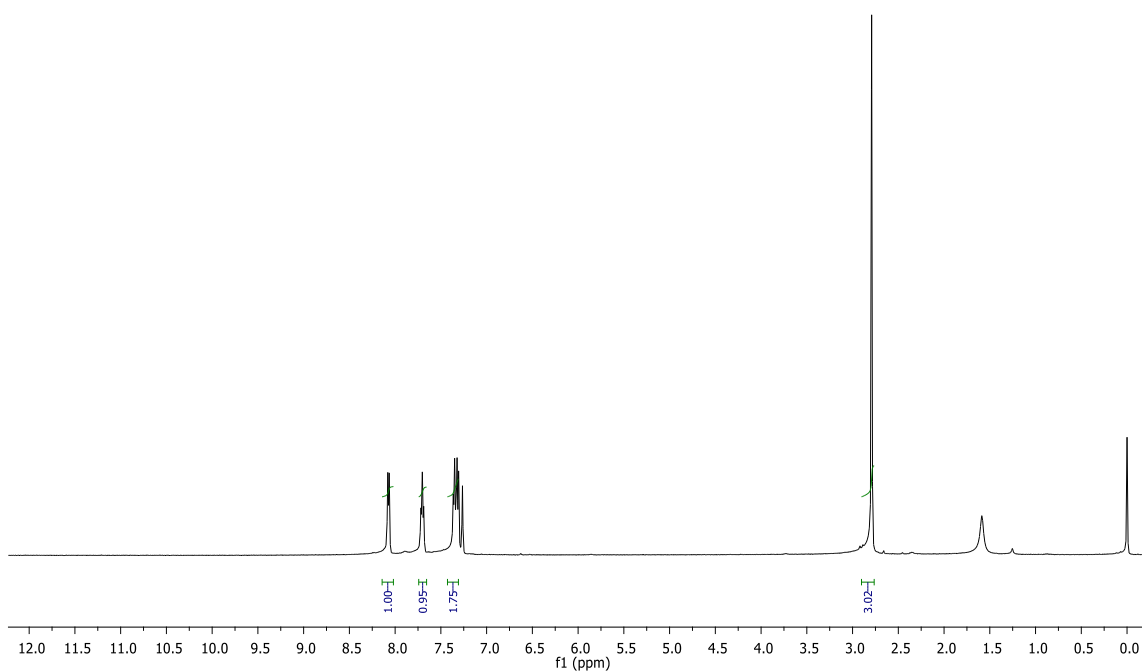
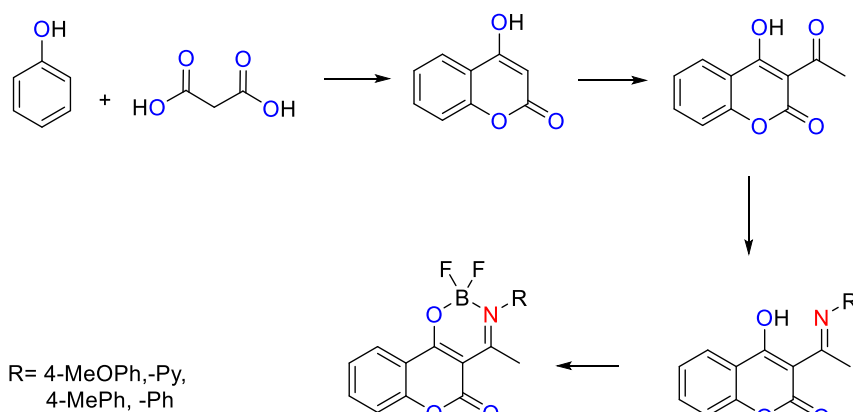


Figura 56. Espectro RMN-¹H de 3-acetil-4-hidroxycumarina en CDCl₃.



Esquema 6. Ruta de síntesis propuesta para compuestos coordinados.

Para realizar la condensación, se utilizó la metodología reportada por Mote *et al.*¹⁰² está consiste en la adición de aminas aromáticas a la cumarina disuelta en etanol, y posterior reflujo para la

¹⁰² Mote, M.S.; Patwari, S. B.; Pachling, S. P. *J. Chem. Pharm. Res.*, **2013**, *5*, 267-270.

obtención de las iminas, en la Figura 57 se muestra un espectro de hidrógeno de una de las moléculas obtenidas. En esta molécula se observa que la señal del acetilo se mantiene además de que aparece un nuevo singulete en 4 ppm correspondiente al metoxilo de la imina, aparece el sistema AB del anillo aromático de la misma, y podemos observar que también aparece el protón del hidroxilo de la posición 4 en 15 ppm.

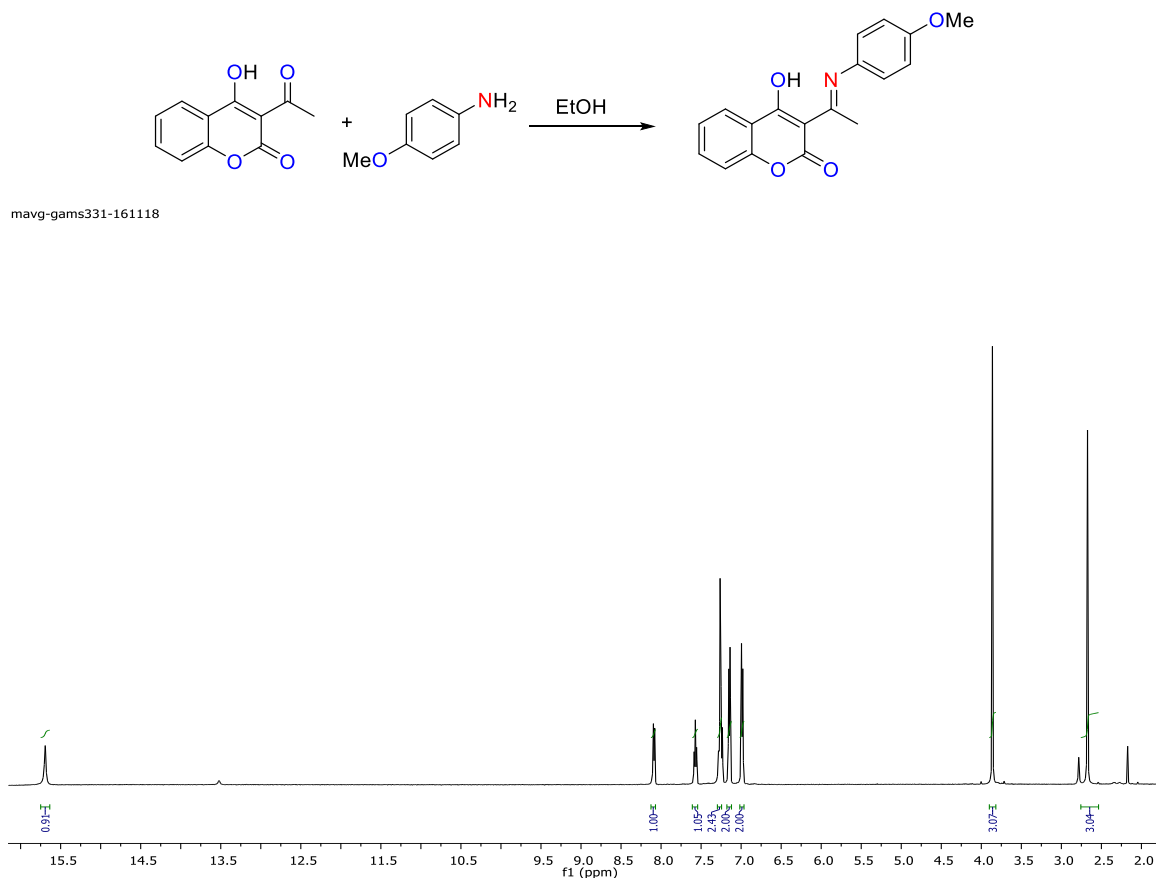
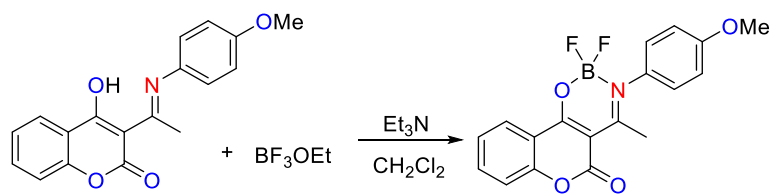


Figura 57. Espectro RMN-¹H de la base de Schiff en CDCl₃, 500 MHz.

Por último, se realizó la coordinación usando la metodología reportada por Zhang *et al.*¹⁰³, esta metodología resulta en un buen rendimiento (%R=70), además de ser práctica y rápida. La purificación se realiza en columna cromatográfica, gracias a que el compuesto obtenido es bastante estable. Cabe mencionar que, a pesar de lo esperado, estos derivados no presentan fluorescencia en solución en cambio lo hacen en estado sólido. En la Figura 58 se muestra un espectro de hidrógeno de uno de los compuestos, observando un desplazamiento de las señales del fenilo de la imina y la desaparición de la señal del hidroxilo en la posición 4.

¹⁰³ Zhang, P.; Liu, W.; Niu, G.; Xiao, H.; Wang, M.; Ge, J.; Wu, J.; Zhang, H.; Li, Y.; Wang, P. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 3456-3462



mavg-gams332-161118

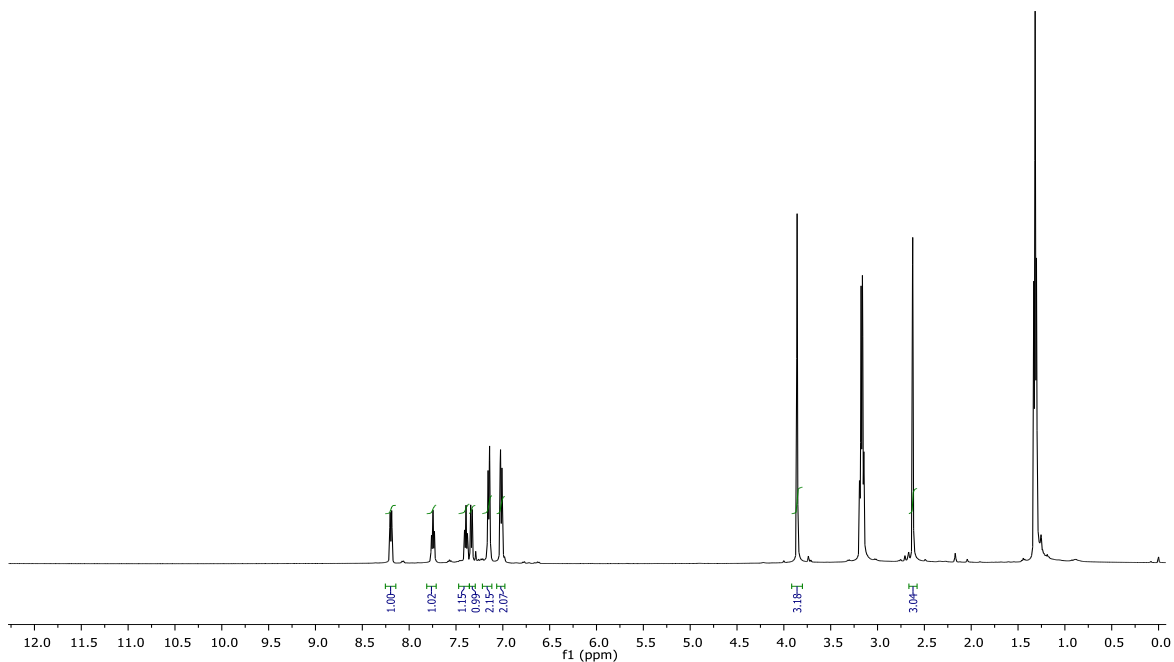


Figura 58. Espectro RMN-¹H del compuesto coordinado en CDCl₃, 500 MHz.

En la Figura 59 se presenta el diagrama ORTEP de la molécula final obtenida, se hace énfasis en señalar que existe una coordinación al átomo de boro tanto por el átomo de nitrógeno como por el de oxígeno, formando un anillo de seis miembros, además existe planaridad en el sistema de la cumarina y la oxazaboridina.

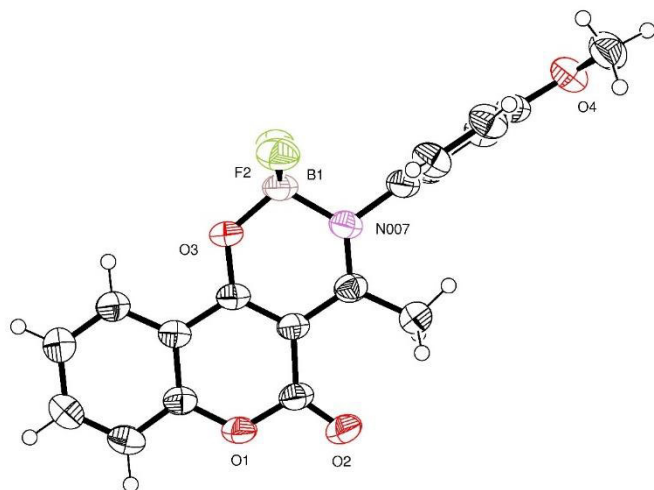


Figura 59. Difracción de rayos X de la cumarina coordinada, oxígenos en rojo, nitrógeno en morado, boro en café y flúor en verde.

Se siguió la metodología encontrada para trabajar con el carbonilo de los ciclopenta[*b*]benzofuranos, pero desafortunadamente la reactividad es muy diferente, en la Tabla 31 se muestra la búsqueda de las condiciones de reacción para aumentar rendimientos, y se utilizan las mejores condiciones. En la Figura 60 se muestra un espectro de hidrógeno de la molécula obtenida; se esperaba que la condensación se realizara en el carbonilo de cetona, pero tras una elucidación por difracción de rayos-X, se observa que al utilizar el ácido como catalizador (Entrada 2) se obtiene una enamina ya que se hace reaccionar al enol en lugar del carbonilo endocíclico.

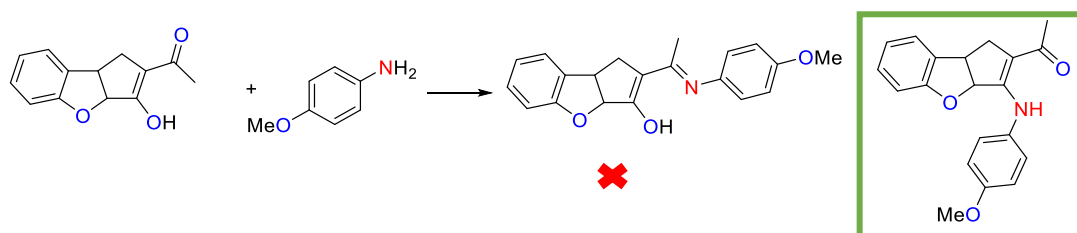


Tabla 31. Condiciones de reacción para la síntesis de enaminas.

Exp.	R	No.	Disolvente	T (°C)	t (h)	Cat.	Observaciones
1					4	-	No hay transformación
2			EtOH	90	3		Transformación completa %R= 40%
3	H	105		140 (MW)	1		Transformación completa %R= 16%
4			MeOH	90	3	AcOH	Transformación completa %R= 16%
5			DCE	90	3		Transformación completa %R= 30%
6	7-Br-	107	EtOH	90	3		%R= 50
7	5-EtO-	109	EtOH	90	3		%R= 60

8	7-MeO-	106	%R= 60
9	6-Et ₂ N-	108	%R= 60

Pase a que existe transformación completa, el rendimiento es moderado, esto se atribuye al proceso de purificación, puesto que se realiza en cromatografía en columna, además estos compuestos presentan cierta inestabilidad por lo que al sintetizarlos son inmediatamente usados en la coordinación con el ácido de Lewis de boro (BF₃). La Figura 58 muestra un espectro de hidrógeno de la molécula correspondiente a la enamina sin sustituyentes en el anillo aromático del ciclopenta[*b*]benzofurano, se observa la señal correspondiente a la enamina a campo bajo, además de las señales de anillo aromático de la misma.

MAVG-GAMS333F1-291118

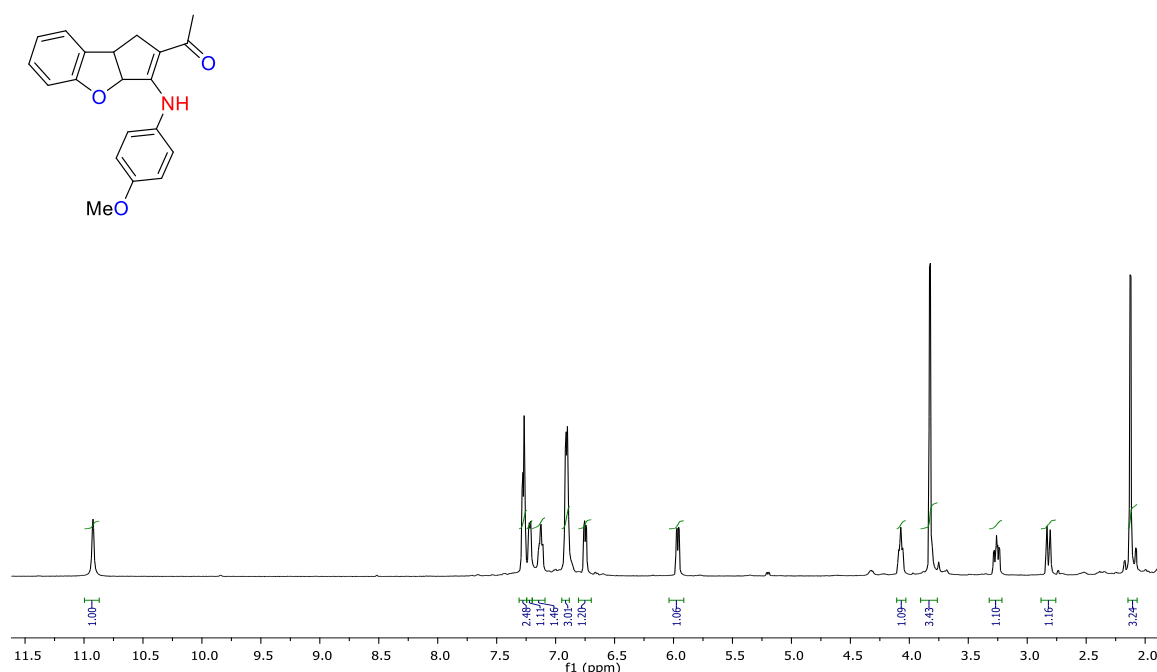


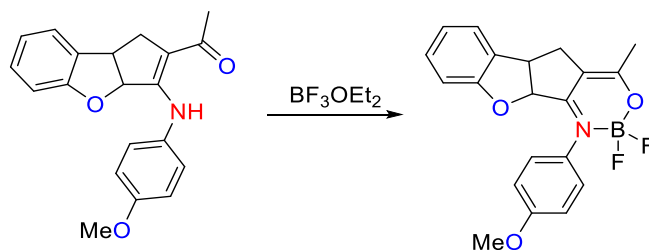
Figura 60. Espectro RMN-¹H de base de enamina **105** en CDCl₃, 500 MHz.

Para realizar dicha coordinación, se intentó realizar el mismo procedimiento previamente mencionado en este capítulo, pero de nueva cuenta no funcionó, en la Tabla 32 se muestra la búsqueda de condiciones para obtener los compuestos coordinados, así como sus rendimientos base pura. La estructura final es corroborada mediante difracción de rayos X (Figura 61), en este caso, la distancia entre los carbonos marcados como C2 y C3 es de 1.419 Å, mientras que para C3 y C12 es de 1.355 Å, señalando que debido a la deslocalización de la densidad electrónica del H proveniente de la enamina, el enlace doble ahora se encuentra entre dichos átomos por el acortamiento de la distancia; así mismo la distancia entre N y C2, ahora es de 1.302 Å, indicando la formación de una imina. Para esta estructura, existe una torción significativa del anillo de ciclopentano respecto al dihidrobenzofurano, formándose un ángulo de aproximadamente 90°.

En resumen, no existe planaridad en la molécula, lo que hace que la molécula no presente una fluorescencia probable.

Por último, podemos observar que los hidrógenos de los átomos de carbono de fusión (C1-C5), se encuentran orientados a la parte posterior del plano, esto puede presentar una ventaja si se quisieran remover mediante alguna oxidación para poder aromatizar a la molécula. Al igual que el caso anterior, la oxazaborinina obtenida muestra una coordinación al átomo de boro tanto por el oxígeno como por el nitrógeno, y resulta en un anillo planar de 6 miembros.

Tabla 32. Condiciones y rendimientos de los compuestos coordinados.



Exp. No.	R	Disolvente	Base	T (°C)	t (h)	Observaciones
1				0	1	No hay transformación
2	110 H-			25	2	No hay transformación
3						Transformación completa %R= 60
4	111 7-MeO-	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N			%R=70
5	112 7-Br-			70	4	%R=60
6	113 5-EtO-					%R=80
7	114 6-Et ₂ N-					%R=80

Con las características previamente mencionadas, las moléculas no presentan fluorescencia en solución, pero todas poseen una emisión intensa en estado sólido. El posterior uso de estas permitirá su aplicación en futuros proyectos del grupo de investigación como materiales en actividad óptica y fluorescencia de contraste.

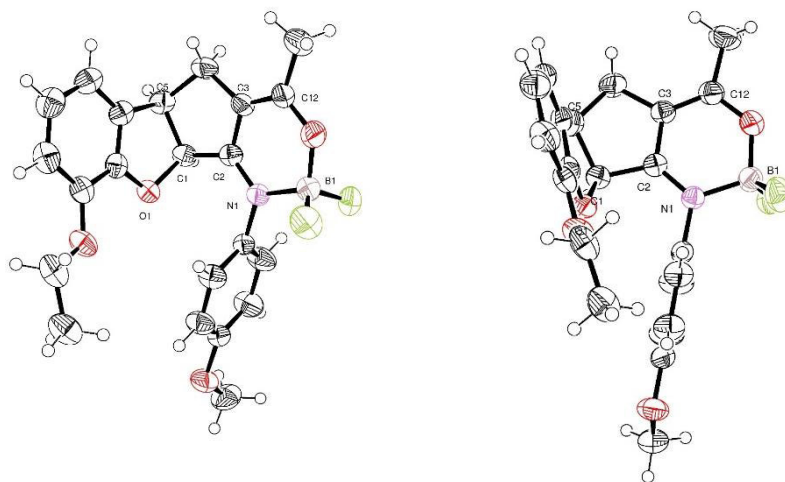


Figura 61. Difracción de rayos X de una rocamidamida coordinada, oxígenos en rojo, nitrógenos en morado, boro en café y flúor en verde.

3.6.2 ANÁLISIS UV

Para continuar con el estudio de sus propiedades fotofísicas, se comenzó con la obtención de su espectro en UV-vis, el disolvente utilizado fue MeOH, puesto que permitía una solución homogénea de todos los compuestos, además de facilitar la manipulación de las muestras. En la Tabla 33, se enlistan las longitudes de máxima absorción de la serie de moléculas obtenidas, siendo rocamidamidas (**100-104**), enaminas (**105-109**), oxazaborininas (**110-114**).

Tabla 33. Longitudes de onda de máxima absorción de los compuestos obtenidos.

Compuesto	λ_{\max} (nm)	Compuesto	λ_{\max} (nm)	Compuesto	λ_{\max} (nm)
100	286	105	344	110	337
101	297	106	348	111	340
102	288	107	353	112	339
103	287	108	287	113	337
104	307	109	352	114	339

Se puede observar una tendencia al desplazamiento batocrómico en todos los derivados, esto por el efecto auxócromo del átomo de nitrógeno añadido a las estructuras, así como la coordinación con el ácido de Lewis en el compuesto. En la Figura 62, se muestra la gráfica normalizada de las absorciones de la familia de compuestos con y sin sustituyente en el anillo aromático, en negro se representa la rocamidamida, en naranja la enamina correspondiente, y el verde el compuesto coordinado, se observa que la banda de absorción en 286 nm, va perdiendo intensidad en cada etapa de reacción, también se modifica el desplazamiento de la nueva banda de máxima absorción a longitudes de onda mayor, casi llegando al espectro visible.

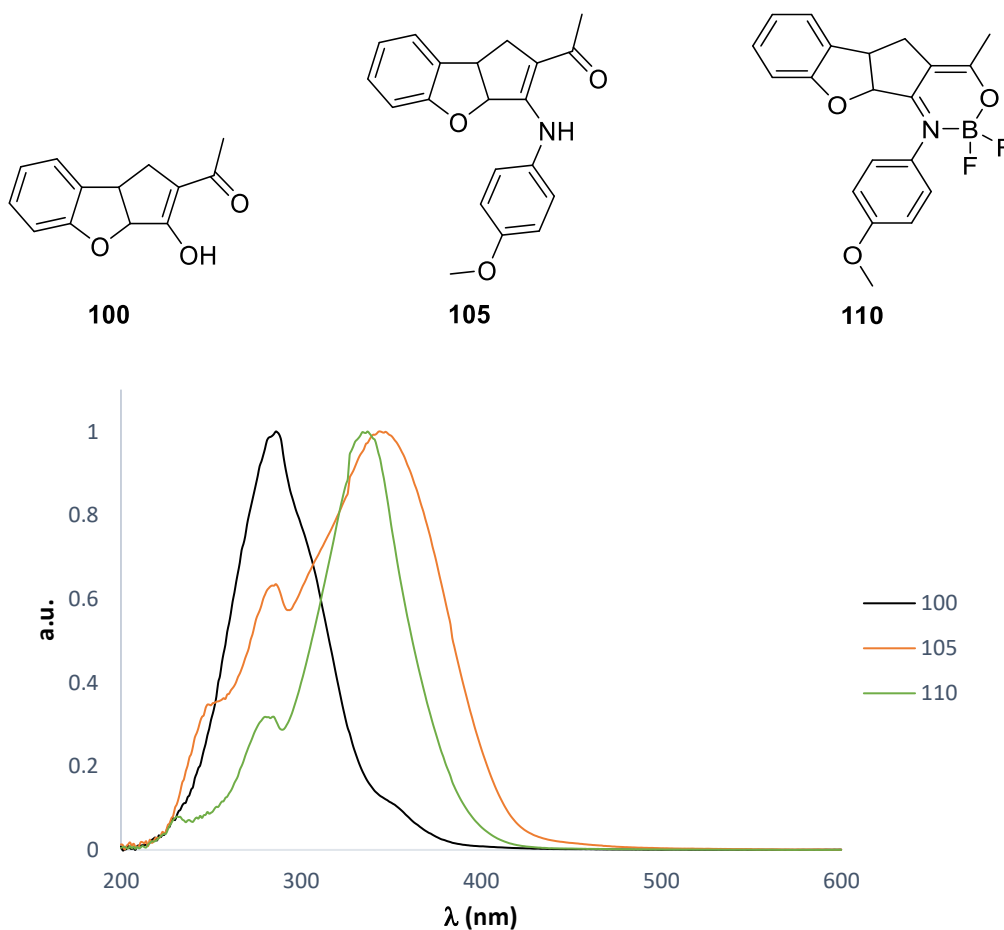


Figura 62. Espectros normalizados UV, de la familia de compuestos sin sustituyente en el anillo aromático.

Esta tendencia es observada para todos los derivados, quedando claro que la modificación estructural cumple con el propósito de cambiar las longitudes de máxima absorción. Como se ha mencionado previamente, estas estructuras no presentan emisión de fluorescencia en solución, la emisión solo ocurre al momento de solidificar las muestras. En la Figura 63, se puede observar que al aplicar luz UV sobre la molécula **113** el sólido este emite luz color azul.



Figura 63. Emisión de luz de la molécula **113** en estado sólido.

3.7 CONCLUSIONES

Se sintetizaron 5 derivados coordinados en rendimientos moderados 60-80%, con un rendimiento global bajo, a pesar de que las condiciones para la apertura de la cumarina y posterior ciclación fueron las mejores. Los compuestos sintetizados abren un panorama para la aplicación de fluorescencia en sólido, que puede ser utilizada en materiales con actividad óptica, fluorescencia de contraste, microscopía, etc. Se puede apreciar la influencia del sustituyente en la modulación de la longitud de emisión, debido al cambio en la coloración que se observa de acuerdo con cada sustituyente en el anillo aromático de las moléculas. Los derivados de rocaglamida son las primeras estructuras de su tipo en presentar fluorescencia lo que cumple con el objetivo propuesto.

Por otro lado, los derivados de cumarina tampoco presentan fluorescencia en solución, pero son plataformas interesantes para su modificación, ya que son las primeras obtenidas en el grupo de investigación en mostrar fluorescencia en estado sólido.