

## Diseño y síntesis de inhibidores de anhidrasa carbónica

Itzel Nohemi Gutiérrez Barroso,<sup>1</sup> Carlos Adrián Cano Preciado,<sup>1</sup> Jesús Edgar González Suarez,<sup>1</sup> Kevin Andani Quintanilla Muñoz,<sup>1</sup> Emmanuel Martínez Rodríguez,<sup>1</sup> Enrique Eduardo Salazar Calderón,<sup>2</sup> Selene Lagunas-Rivera,<sup>1</sup> Yolanda Alcaraz-Contreras,<sup>2</sup> Adriana Galvan,<sup>1</sup> Miguel A. Vázquez.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto.

<sup>2</sup>Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto.

[mvazquez@ugto.mx](mailto:mvazquez@ugto.mx)

### Resumen

Una de las familias de metaloenzimas de expresión ubicua presentes en células procariontas y eucariotas son las anhidrasas carbónicas -AC- (EC4.2.1.1). Las cuales forman parte importante de procesos fisiológicos y patológicos, entre ellos, la gluconeogénesis, lipogénesis, tumorigenicidad, crecimiento y virulencia de diversos patógenos. Este tipo de enzimas tiene como función principal una transformación fisiológica esencial, la cual, involucra la conversión de CO<sub>2</sub> en iones bicarbonato y protones. Este tipo de enzimas es un punto importante para la respiración y transporte de CO<sub>2</sub> y carbonatos entre los tejidos metabólicos y los pulmones, asimismo, la homeostasis del pH, la secreción de electrolitos en diversos tejidos y órganos, reacciones biosintéticas (antes mencionadas) resorción ósea, y calcificación, entre otras. Por otro lado, este tipo de enzimas han sido empleadas como dianas terapéuticas, es decir su inhibición es importante para tratar diversos trastornos como edema, glaucoma, obesidad, cáncer, epilepsia y osteoporosis. Su centro catalítico es Zn<sup>+2</sup> por lo que, el diseño de inhibidores de AC se enfoca en dos estrategias: 1) quelación del metal, y 2) tener derivados de azufre en la estructura. En este documento, se describirá la síntesis de diferentes heterociclos con grupos funcionales para ser modificados con la finalidad de una posterior funcionalización para ajustarse al modelo farmacofórico de quelantes de Zn<sup>+2</sup>.

**Palabras clave:** Heterociclos, metaloenzimas; anhidrasas carbónicas; inhibición; diana terapéutica.

### Antecedentes

Las metaloenzimas son aquellas estructuras en las que el sitio activo en general es un metal. Entre estas, se encuentra la familia de las anhidrasas carbónicas (ACs), las cuales cuentan con un átomo de zinc en su sitio activo unido a tres moléculas de histidina: HIS94, HIS119 e HIS96 (Figura 1). La principal función de las ACs es la catálisis en la hidratación/deshidratación reversible del dióxido de carbono a bicarbonato.<sup>1</sup> Dentro de la clasificación, se han encontrado siete familias, que se dividen dependiendo de su estructura de plegamiento en: AC- $\alpha$ , AC- $\beta$ , AC- $\delta$ , AC- $\gamma$ , AC- $\zeta$ , AC- $\eta$  y AC- $\theta$ . Las AC- $\alpha$  se encuentran presentes en plantas, algas, vertebrados y bacterias, son las únicas que se pueden encontrar en el ser humano y se dividen en 16 isomorfos de anhidrasa carbónica (CA-I, II, III, IV, VA, VB, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV y XV).<sup>2</sup>

El equilibrio entre CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sucede naturalmente sin la enzima AC de forma continua en el organismo, sin embargo es un proceso muy lento, mientras que, en la presencia de la enzima AC se alcanza una velocidad 100 veces mayor.<sup>3</sup> El sitio activo de la enzima es un átomo de zinc que se encuentra enlazado a un grupo hidroxilo, lo que provoca una reacción nucleofílica al CO<sub>2</sub> generando un ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> enlazado al zinc que, gracias a una molécula de agua, se libera al medio con un protón, regenerando la especie catalítica activa (Figura 1).<sup>4</sup>

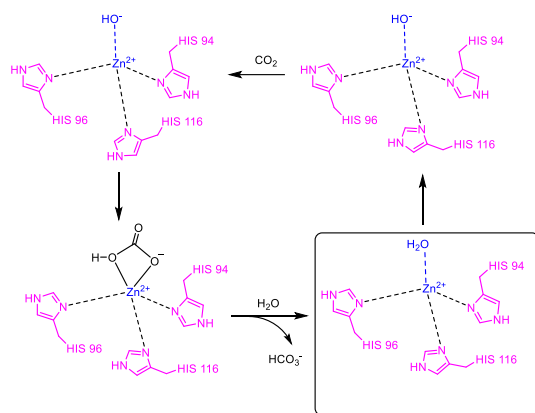


Figura 1. Estructura de la anhidrasa carbónica y Mecanismo de acción de la anhidrasa carbónica.

Esto permite entender porque forman parte importante de numerosos procesos fisiológicos y patológicos, entre ellos, la ruta metabólica anabólica para la síntesis de glucosa (gluconeogénesis), la secuencia de reacciones bioquímicas para la síntesis de ácidos grasos y su posterior funcionalización para la generación de triglicéridos (lipogénesis), tumorigenicidad, crecimiento y virulencia de diversos patógenos.<sup>5</sup> Las ACs juegan un papel muy importante en los sistemas de intercambio iónico, pues potencializan el transporte de  $\text{CO}_2$  de la sangre hasta los pulmones por medio de un anclaje al carbono terminal de la proteína banda 3 de los eritrocitos,<sup>6</sup> además que facilita la eliminación y disminución de la concentración intracelular del  $\text{HCO}_3^-$  mediante su interconversión a  $\text{CO}_2$ .<sup>7</sup> Como es de esperarse, las ACs se encuentra en muchos de los tejidos del cuerpo humano, sin embargo, dependerá mucho de su ubicación para saber cómo lleva a cabo su cinética y función. Las ACs se encuentran en tejido óseo, intestinal, renal, cardíaco, pulmonar y hepático.<sup>8</sup> La isoforma VA se localiza en la mitocondria de las células del hígado y desempeñan funciones en las regulaciones de las rutas metabólicas, tales como la gluconeogénesis, participando en la síntesis de piruvato carboxilasa para obtener de manera anaerobia la glucosa; además de estar involucrada en la síntesis de carbamifosfato sintetasa 1 (ciclo de la urea), 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (involucrada en la catálisis de aminoácidos) y la propionil CoA carboxilasa.<sup>9</sup> Mientras tanto, en el tracto intestinal, las ACs tienen una función muy importante que es la regulación del pH y la participación en el transporte en la membrana. Las enzimas de AC se encuentran a lo largo de todo el tracto digestivo, comenzando por el esófago donde se expresan las isoenzimas II y IV con mayor actividad. La AC interviene en la eliminación del  $\text{CO}_2$  y sus principales metabolitos, además que actúa como regulador de pH para evitar que el ácido gástrico llegue hasta la parte superior.<sup>10</sup> En las células pulmonares, la anhidrasa carbónica es la encargada de facilitar el intercambio de  $\text{CO}_2$  a los alveolos, además de evitar variaciones importantes de pH mientras se transporta la sangre a través de los canales capilares,<sup>11</sup> mientras que en los riñones, su principal función es la de evitar la absorción de agua en un 30 % y bicarbonato en un 60 % del tejido renal,<sup>12</sup> además de promover la reducción de la concentración de  $\text{CO}_3^{2-}$  mediante la liberación de protones debido a la actividad enzimática, esto con el fin de evitar su acumulación y se vean afectados los procesos de transporte.<sup>13</sup> Los estudios sobre las CAs han revelado de manera concluyente su influencia significativa en enfermedades como el glaucoma, la obesidad, la osteoporosis, el cáncer, el mal de altura, la epilepsia, el dolor neuropático y la apnea del sueño. Debido a esto, muchas isoformas de las CAs se consideran objetivos cruciales para el desarrollo de inhibidores con fines clínicos.<sup>14</sup> Se ha reportado que los protones generados por la hidratación del  $\text{CO}_2$  no solo contribuyen a la acidificación del entorno extracelular, característica de la mayoría de los cánceres, sino que el bicarbonato resultante se emplea como fuente de carbono para diversas reacciones biosintéticas. Estas reacciones convierten el bicarbonato en compuestos orgánicos, proporcionando a las células cancerosas los intermediarios necesarios para mantener su rápida proliferación.<sup>15,16</sup> Por otro lado, diversas enfermedades óseas tienen relación con las CAs. Se ha observado que el aumento en la expresión de CA-I provoca la precipitación y la osificación en células de osteosarcoma. Además, estudios han encontrado que la sobreexpresión de CA-I agrava la inflamación y la destrucción articular en un modelo de ratones transgénicos. Estudios *in vitro* también han revelado que CA-I promueve la formación de  $\text{CaCO}_3$  y mejora la reacción de hidratación, lo cual es crucial para la formación ósea. Esta actividad puede ser problemática en pacientes con artritis reumatoide, donde la expresión elevada de CA-I podría contribuir a una mineralización inapropiada al promover la deposición de sales de calcio.<sup>17</sup>

La modificación del pH tanto intracelular como extracelular es crucial para la regulación de la excitabilidad neuronal. Pequeñas variaciones en estos niveles de pH afectan significativamente la función de los canales regulados por ligandos y voltaje, que participan activamente en las convulsiones. Se ha descrito que la acidificación del ambiente intracelular detiene la actividad convulsiva en el giro dentado. Por lo tanto, las AC-II son fundamentales en enfermedades cerebrales, ya que controlan de manera activa el pH.<sup>18,19</sup>

El desequilibrio y no regulación de las ACs está altamente relacionada con numerosas enfermedades. Es por ello, que se han desarrollado inhibidores de AC como diana terapéutica. Los inhibidores más comunes son los derivados de sulfonamidas, ya que estos logran brindar la geometría adecuada para poder quelar el átomo de zinc del sitio activo de la enzima (Figura 2). El glaucoma es una enfermedad que aumenta la presión en el interior del globo ocular, causando daño óptico, y en casos severos, ceguera. Este aumento de la presión se debe al aumento en las concentraciones de bicarbonato, por lo que se puede atribuir una de las causas a la AC.

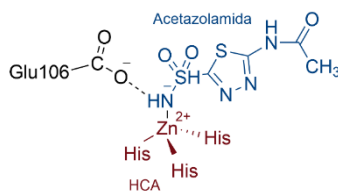


Figura 2. Quelación del Zinc con acetazolamida con HCA II.

Las enzimas anhidrasa carbónica son fundamentales en procesos como la respiración, la regulación del pH, y la secreción de electrolitos. Además, son objetivos terapéuticos clave para enfermedades como el glaucoma, la obesidad, el cáncer y la osteoporosis. Ya diversos estudios han apuntado a como el exceso de actividad de esta enzima puede contribuir a estas enfermedades, es por ello por lo que en las últimas décadas el estudio de posibles inhibidores de AC ha cobrado relevancia, se diseñan principalmente mediante la quelación del zinc en su centro catalítico o mediante el uso de derivados de azufre. De esta manera, en este proyecto de verano el objetivo fundamental fue el desarrollo de las mejores condiciones de reacción para la síntesis de oxo- y aza-heterociclos, en una etapa posterior se desarrollarán derivados de urea y ácidos hidroxámicos como posibles quelantes del co-factor  $Zn^{+2}$ .

## Resultados y Discusión

En este proyecto de verano se propuso construir heterociclos con diferente patrón de sustitución con la finalidad de: 1) seguir con su funcionalización para incorporar fragmentos que puedan quelar metales, y 2) analizar sus propiedades fisicoquímicas para su posterior evaluación biológica. Con esta consideración, se planteó la síntesis de heterociclos descritos en la Figura 3.

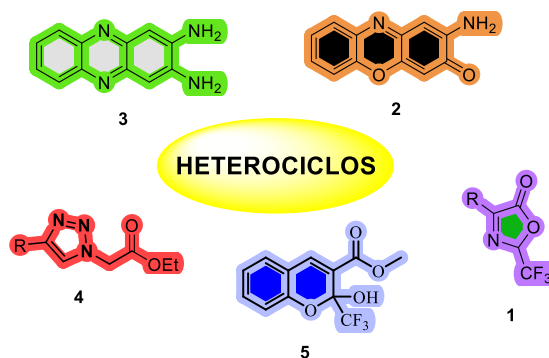


Figura 3. Heterociclos propuestos en este verano de investigación 2024.

Las oxazalonas (1) son moléculas heterocíclicas de cinco miembros ampliamente estudiadas como parte de andamiajes farmacológicamente relevantes. Los derivados de oxazalonas altamente sustituidos pueden ser

fácilmente sintetizados mediante modificaciones directas en diferentes sitios activos. Se ha informado que los derivados de oxazolonas sustituidos tienen numerosas aplicaciones farmacológicas, como antimicrobianos, inhibidores de DAPK, inhibidores de ureasa y potenciales agentes anti-obesidad o antidiabéticos.<sup>20</sup> Planteado lo anterior, en este objetivo se realizó la síntesis de estos heterociclos mediante la reacción general mostrada en la Figura 4.

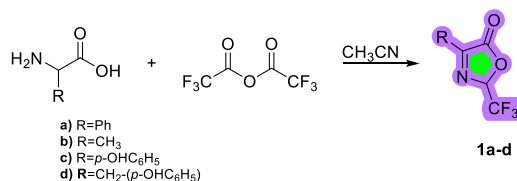


Figura 4. Metodología general para la síntesis de oxazolonas.

Los aminoácidos DL-Tirosina, DL-Alanina, 2-fenilglicina y 4-hidroxi-2-fenilglicina, así como el anhídrido trifluoroacético se adquirieron en Sigma Aldrich y se utilizaron sin ninguna modificación adicional. El progreso de la reacción fue monitoreado por CCF empleando una solución de ninhidrina al 1 % p/v en etanol como agente revelador. Las oxazolonas fueron obtenidas a temperatura ambiente y a diferentes tiempos que dependió de la reactividad de los aminoácidos, la 2-fenilglicina y 4-hidroxi-2-fenilglicina después de la purificación por recristalización fueron sólidos amarillo y blanco, respectivamente. Los rendimientos calculados fluctúan del 84 al 93 %. Las oxazolonas de alanina y tirosina presentaron rendimientos más bajos del 27 al 43 %, respectivamente, ambas como líquidos viscosos. Las posibles causas por las que el rendimiento decae son los tratamientos después de que la reacción se haya completado. Es necesario cerciorarse de una neutralización completa y evitar la descomposición del heterociclo realizando las extracciones lo más rápido posible. Además, es necesario plaquear la fase orgánica y acuosa para corroborar que no haya presencia del aminoácido junto con la oxazolona. La ninhidrina permite reconocer el grupo amino de la materia prima y poder conocer el estado de nuestro crudo, todos los compuestos fueron caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, y corroborados con lo reportado en la literatura,<sup>21</sup> actualmente estos sistemas son empleados como materias primas en la reacción de cicloadición Diels-Alder.

Por otro lado, las fenoxazinas (2) y fenazinas (4) son heterociclos con interés farmacéutico debido a sus propiedades como antioxidantes, antimicrobiales y anticancerígenas.<sup>22</sup> Además, debido a sus propiedades ópticas tienen aplicaciones en el área de los sensores, síntesis de copolímeros fotolumincentes, y en el desarrollo de materiales para celdas solares (Figura 5).<sup>23</sup>

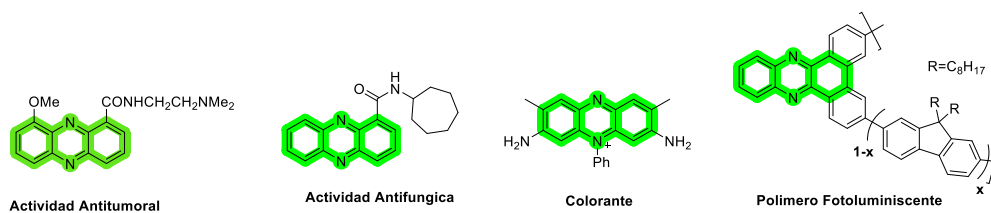


Figura 5. Ejemplos de fenazinas en diversas aplicaciones.

Existen en la literatura trabajos donde se han acoplado este tipo de sistemas, por ejemplo, se ha reportado el acoplamiento de *o*-fenilendiaminas utilizando FeCl<sub>3</sub> para la obtención de fenazinas,<sup>24</sup> Vaccaro L. y colaboradores utilizaron un sistema catalítico heterogéneo de manganeso en un reactor de flujo continuo en combinación con oxígeno molecular para llevar a cabo el acoplamiento oxidativo C-H de sistemas como 2-aminofenol, benzotriazoles y *o*-fenilendiaminas,<sup>25</sup> En este sentido, el primer acercamiento para implementar una metodología empleando materiales mesoporosos fue abordada en este verano, empleando CuBr y piridina en fase homogénea, permitiendo conocer la reacción para un posterior estudio en materiales empleados en catálisis heterogénea. Uno de los mayores problemas en la síntesis de compuestos químicos tanto en la industria química como en la academia, es la generación de residuos tóxicos y poco amigables generados por el uso de agentes oxidantes en cantidades estequiométricas. A la luz del desarrollo de la química sostenible es importante la búsqueda de nuevas rutas que superen estos desafíos, aunado a esto, los derivados de fenoxazinas (2) y fenazinas (3) son moléculas de gran importancia química y la mayor parte de las metodologías existentes involucran el uso de metales pesados y tóxicos. La síntesis de la 2,3-diaminofenazina y fenoxazinas (2 y 3 respectivamente) se llevó a cabo en un sólo paso. En el Esquema 1 se

muestra un plausible mecanismo de reacción que inicia con la mono oxidación/oxidación de un solo electrón de la *o*-fenilendiamina mediada por el complejo de cobre ( $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ -peroxo) dicobre (II) **A** producido in situ por la oxidación del complejo Ln/Cu<sup>I</sup> **B**. Posteriormente, la especie electrofílica oxidada **I** reacciona con otro equivalente de *o*-fenilendiamina produciendo la especie intermediaria **II** con un enlace sigma de tres electrones, la cual consecutivamente perderá un electrón y un protón conduciendo a la generación de la especie **III**. Esta especie sufre una desprotonación y consecuente pérdida de agua para dar la estructura **IV**, terminando con la liberación de un protón al medio y generando el correspondiente producto **3**.

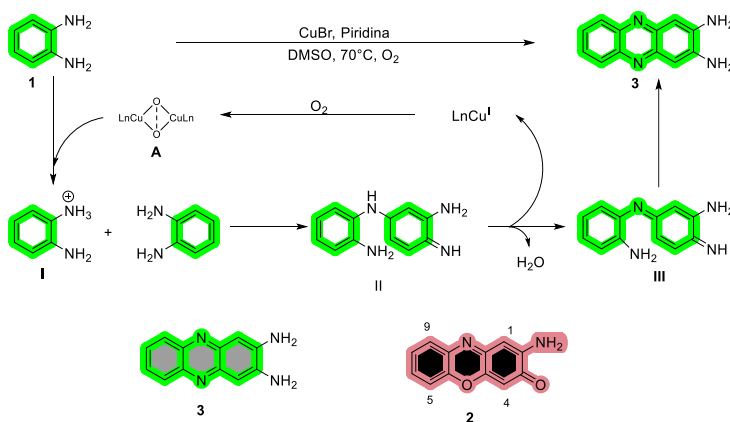


Figura 6. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de fenazinas a través del uso de CuBr y piridina.

El procedimiento fue emplear la 1,2-bencendiamina y CuBr empleando piridina y EtOH como disolventes irradiados por ultrasonido. El tubo fue sonificado en un baño de ultrasonido a 29 °C durante al menos una hora bajo condiciones de presión positiva de O<sub>2</sub>. Después de este tiempo, el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna generando el producto en un 70% de rendimiento. Por <sup>1</sup>H NMR en DMSO se observaron las señales principales a 7.89 ppm como un dd y un constante de acoplamiento (*J*) de 5.7 y 3.3 Hz que integra para 1 hidrógeno, además, de otras señales en 7.54 (dd, *J* = 6.3, 3.3 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.26 (s, 2H). Finalmente, por <sup>13</sup>C NMR se observaron señales en 144.13, 142.10, 140.32, 127.89, 126.47, 102.20 ppm, que coinciden con las esperadas. Durante la experimentación bajo las condiciones descritas (de 17 experimentos para optimizar proceso), se evaluó la efectividad de diferentes disolventes en la síntesis del derivado de fenazina y fenoxazina buscando un enfoque ajustable al término de la química verde. El disolvente que se acerca más a dicho enfoque, y en el que hubo un mayor avance de reacción medido fue el etanol. Después de proceder a 1 M, el aumento en la concentración puede generar una mayor cantidad de subproductos. Así mismo, se valoró la importancia de la piridina como ligante en el medio de reacción, observando un avance menoritario de la reacción en las entradas en las que se prescindió de esta base.

Por su parte, a lo largo de 27 ensayos para optimizar el proceso del acoplamiento oxidativo de la 2-aminofenol para la síntesis de la 2-amino-3H-fenoxazin-3-ona (**2**), se evaluó la capacidad de diferentes especies de cobre, concentración del sustrato (0.33-1.00 M), carga del catalizador (0-15 %), donde se analizó la efectividad de diferentes disolventes, presencia o ausencia de ligante piridina (0 o 18 %), temperatura de reacción (25-35 °C), tiempos de reacción, orden de adición y uso de un agente oxidante adicional amigable con el medio ambiente (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) con el fin de reducir el uso de compuestos químicos tóxicos y la producción de residuos contaminantes. El procedimiento para el acoplamiento oxidativo de la 2-aminofenol fue emplear CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (10%), piridina (18%), isopropanol como disolvente, y O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) como agentes oxidantes bajo unas condiciones de reacción de: temperatura 25-30 °C durante aproximadamente 1 hora en un baño de ultrasonido. Después de esto, el crudo de reacción se soportó en sílica gel al vacío. El residuo fue purificado por cromatografía en columna de celita y sílica gel utilizando un gradiente de sistemas de 0-10% de metanol en diclorometano. Por último, se realizó una recrystalización en agua. Luego de la optimización de las condiciones de reacción, se obtuvo un rendimiento de 75% con apariencia de un polvo sólido de color negro. Por RMN <sup>1</sup>H se observaron las señales en 7.76 ppm como un doble y constantes de acoplamiento de 7.9 Hz, que integra para 1H el cual fue asignado para H-9 (Figura 6, **3**), además, las señales en 7.53-7.57 (m, 2H, H-7, H-6), 7.45-7.49 (m, 1H, H-8), 6.87 (s, 2H, H-2'), 6.42-6.44 (m, 2H, H-4, H-1). Para el caso de RMN <sup>13</sup>C en ppm se localizó y asigno las señales: 180.69 (C-3), 149.35 (C-4a), 148.71 (C-10a), 147.83 (C-2), 142.39 (C-5a), 134.19 (C-9a), 129.28 (C-7), 128.44 (C-9), 125.74 (C-8), 116.40 (C-6), 103.89 (C-4), 98.83 (C-1) (Figura 6).

Otro núcleo que se abordó en este verano con los derivados de benzopirano (Figura 3, compuesto **5**). El anillo de benzopirano (cromeno) es conocido como una estructura heterocíclica donde el anillo de benceno está fusionado a un 2H- ó 4H-pirano.<sup>26</sup> Este poliheterociclo ha sido identificado como uno de los principales núcleos utilizados en química orgánica y química medicinal debido a la diversidad biológica, que presentan como: antitumoral,<sup>27</sup> anticancerígenos,<sup>28</sup> antifúngicos,<sup>29</sup> antibacteriales,<sup>30</sup> y antimicrobianos,<sup>31</sup> por mencionar algunas. El benzopirano **6** fue sintetizado a través de una condensación de Knoevenagel, donde se empleó salicilaldehído y el trifluoroacetato de metilo. La reacción se realizó en microondas a 100 °C y morfolina como catalizador a un tiempo de reacción de 40 minutos. El producto después de su proceso de recrystalización se obtuvo en un 90 % de rendimiento.

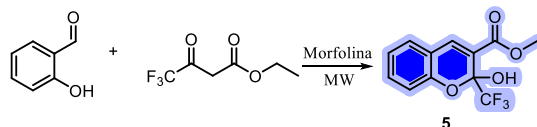


Figura 7. Condiciones de reacción para la síntesis de **6**.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 8) nos ayuda a confirmar el producto. Señales como la H3 del sistema vinílico (7.8 ppm) y la del alcohol (OH, 7.5 ppm) fueron observadas.

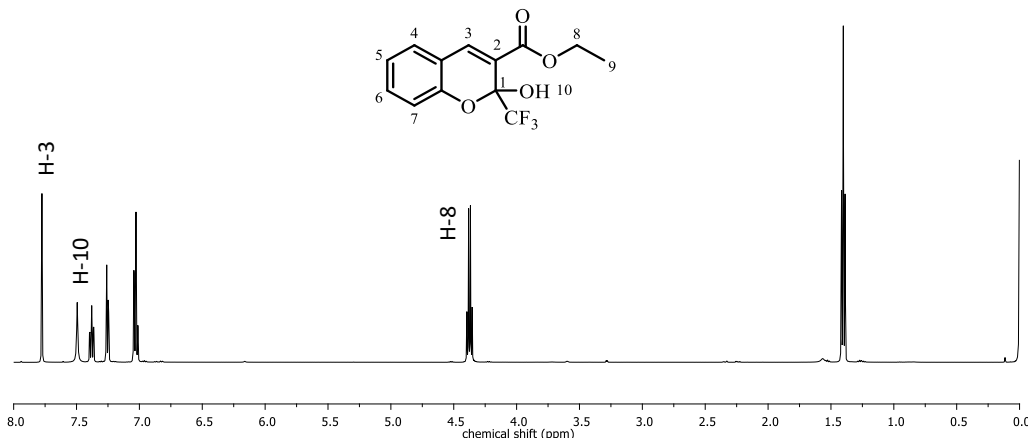


Figura 8. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **6**.

Se probó la reactividad del benzopirano **5** y anisidina con heteropoliácidos de tipo keggin (HPW-MFC-1.0)<sup>32</sup> como una nueva vía de síntesis de bases de Schiff (Figura 9).

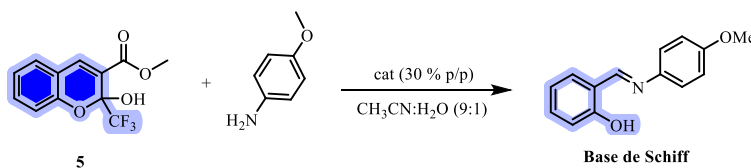


Figura 9. Condiciones de reacción para la síntesis de iminas

Se analizaron los crudos de reacción después de 10 horas con los diferentes catalizadores por RMN-<sup>1</sup>H, comparándolos con los espectros del benzopirano y la reacción modelo (Figura 10). El desplazamiento químico ( $\delta$ ) se referenció respecto a la señal del disolvente (CDCl<sub>3</sub>) 7.26 ppm. Para la base de Schiff se observa el protón vinílico con un desplazamiento químico de 8.59 ppm [7, CH=N, s], un singulete en 13.42 ppm correspondiente al hidroxilo [1, -OH, s], también se aprecian señales características de los sistemas aromáticos en 6.92-7.37 ppm, por último, a campo alto se encuentra la señal ocasionada por el metoxilo en

3.83 ppm [14, -OCH<sub>3</sub>, s]. En el espectro del benzopirano se aprecian señales representativas para los anillos aromáticos en 7.40-7.01 ppm, para el metino vinílico del pirano se observa una señal en 7.78 ppm [3, HC=C, s], el singlete ocasionada por el hidroxilo aparece en 7.49 ppm [12, -OH, s], para el metileno del etoxilo se muestra un cuadruplete en 4.37 ppm [15, -CH<sub>2</sub>-, c] y un triplete para el metilo en 1.40 ppm [16, -CH<sub>3</sub>, t]. En los espectros (Figura 10) se puede observar la conversión de cada una de las reacciones, siendo las catalizadas con HPW y HPMo a 120 °C con los rendimientos más bajos, no obstante, se observa que la transformación mejora a reflujo. Se cree que el efecto del catalizador es el causante del comportamiento inusual de la reacción, el HPW-MCF-1.0 es un material a base de sílice insertado a un líquido iónico y tiene como contraíon el ácido de Keggin, La morfología del complejo MCF afecta la dualidad del HPW haciéndolo más oxidante. Se sospecha que la imina se forma por una reacción de oxidación entre el benzopirano y la amina, que al ser muy inestable y en presencia de agua se hidroliza a salicilaldehído. Luego, los salicilaldehídos reaccionan con las aminas que aún no se transforman produciendo la base de Schiff. Eso explicaría el tiempo de reacción ya que está limitada por la hidrólisis de la imina y la posterior reacción del aldehído con la amina. Se propuso las bases de Schiff como potenciales inhibidores para la anhidrasa carbónica debido a sus propiedades terapéuticas y por actuar como un posible agente quelante para la eliminación de Zn (II), ya que este posee una alta afinidad por átomos de nitrógeno y oxígeno. No obstante, se requiere hacer un análisis completo de la aproximación de estos ligandos hacia el sitio activo de una de las dianas biológicas de la AC para comprobar su eficiencia.

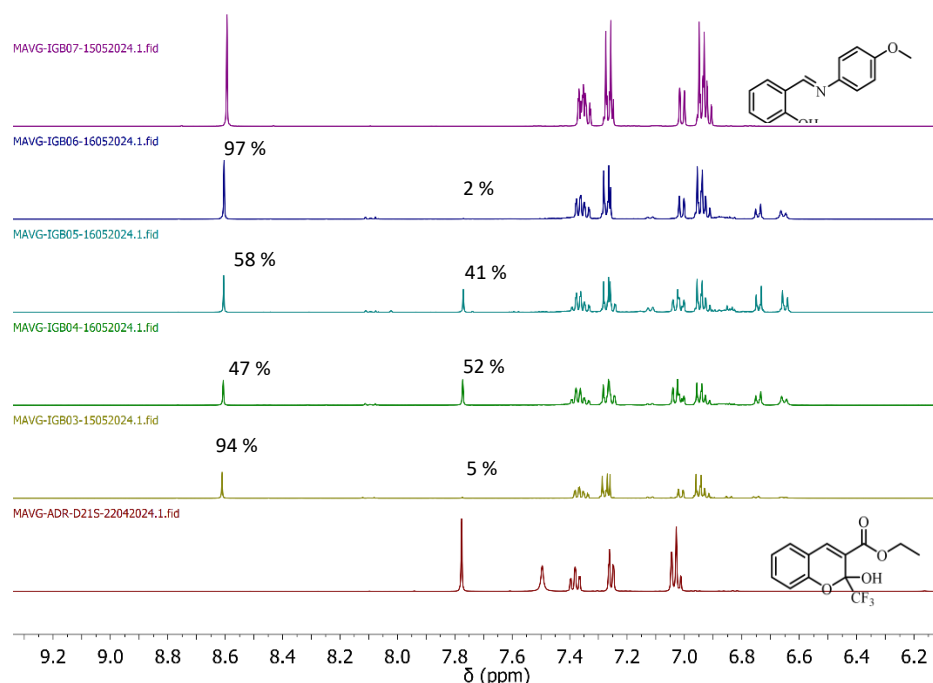


Figura 10. Comparación de los espectros de RMN-1H, 500 MHz, en CDCl<sub>3</sub>

Finalmente, el yoduro de cobre (CuI) se inmovilizó en una matriz de sílice mesoporosa ordenada (SBA-15) funcionalizada covalentemente con un líquido iónico para lograr la síntesis de un catalizador híbrido para este último objetivo según la metodología reportada por el grupo de investigación. La fisorción de N<sub>2</sub>, la microscopía electrónica de barrido con detector de rayos X (SEM-EDS) la espectroscopía infrarroja (FT-IR) y la resonancia magnética nuclear en estado sólido (RMN CP-MAS <sup>13</sup>C, <sup>29</sup>Si) se utilizaron para caracterizar el catalizador resultante. Posteriormente, se examinó su actividad catalítica en la creación de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos tipo **4** mediante una reacción click entre azidas y alquinos terminales con diferentes características electrónicas. Los 1,2,3-triazoles, son compuestos heterocíclicos de nitrógeno de cinco miembros que se han aplicado en algunos campos de investigación como: química de materiales, química de polímeros, síntesis orgánica, química medicinal y síntesis farmacéutica. Estos heterociclos funcionalizados han mostrado importantes actividades biológicas tales como: inhibidor de indolamina 2,3-dihidroxigenasa 1

(IDO1). Esta enzima está directamente relacionada a la inducción de mecanismos inmunosupresores y muestra potentes actividades inhibitoras en las células MDA-MB-231. Los estudios de la actividad revelan que la regulación de la actividad enzimática de IDO1 en la presencia de esos compuestos puede inducir una respuesta inmune contra las células de cáncer de mama.<sup>33</sup> (Figura 11-1d). En el tratamiento de la diabetes Mellitus tipo 2 son importantes debido a que participan en el desarrollo de nuevos fármacos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, un ejemplo de ello son los híbridos benzimidazoles-1,2,3-triazoles (Figura 11-1b).<sup>34</sup> Los derivados de vainillina-1,2,3-triazoles han demostrado excelentes propiedades en la inhibición de la síntesis de DNA bacteriano (Figura 11-1a).<sup>35</sup> En la Figura 12, se muestra el espectro de CP-MAS RMN de  $^{13}\text{C}$  del estado sólido para MIM-SBA-15. Las señales atribuidas a los átomos de C en el anillo de imidazolio aparecen entre 115 y 145 ppm; mientras que las señales para la cadena alifática se encuentran entre 0 y 40 ppm; Finalmente, el grupo metilo unido a imidazolio aparece alrededor de 50 ppm. Con base en lo anterior, la incorporación del líquido iónico en SBA-15 mediante la técnica de grafting covalente fue exitosa y corrobora con lo publicado por el grupo de investigación.<sup>32</sup>

El primer paso de síntesis consistió en obtener la azida sustituida, en este caso, el azidoacetato de etilo. La transformación es completa y sencilla de purificar. Esta azida fue utilizada para producir todos los triazoles. El segundo paso involucra la cicloadición de Huisgen,<sup>36</sup> la cual es catalizada por Cu(I) para generar el ciclo deseado. El tercer paso involucro una hidrólisis sobre el grupo éster, esta se realiza en condiciones básicas, posteriormente se acidifica el producto para precipitarlo y poder purificarlo. Finalmente, este paso se llevó a cabo la sustitución del hidroxilo del ácido carboxílico, por una hidroxámina, para así formar el ácido hidroxámico **6** (Figura 13).<sup>37</sup> Durante este proceso, también se probó realizar la síntesis del triazol de manera *one pot*, reduciendo así la ruta sintética en un paso. Esta reacción *one pot* se probó con 2 catalizadores distintos, con CuI y con CuSO<sub>4</sub>, este último, se agregaba junto con Ascorbato de Sodio para poder reducir el Cobre, permitiéndole catalizar la reacción. Con estos datos, ahora se empleó el catalizador heterogéneo (CuI@MIM-SBA-15) observando que el proceso ocurre con rendimientos similares (82-92%), otras pruebas serán consideradas en trabajos futuros.

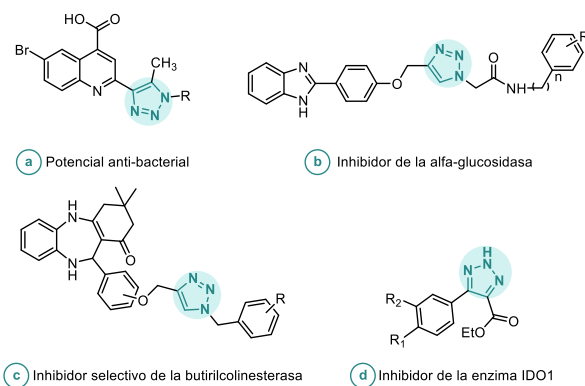


Figura 11. Importancia del núcleo de triazol

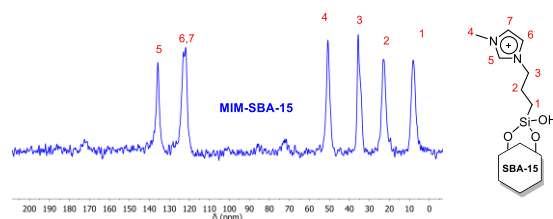


Figura 12. Espectro de CP-MAS RMN de  $^{13}\text{C}$  en estado sólido de los soportes MIM-SBA-15



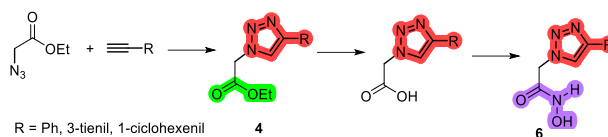


Figura 13. Funcionalización y síntesis de triazoles.

En este verano de investigación se abordó la síntesis de diferentes heterociclos, en cada una de las metodologías se optimizaron las condiciones de reacción, generando el producto deseado, actualmente se encuentra en proceso el análisis del alcance de las metodologías modificando diferentes sustituyentes. La metodología de síntesis de los heterociclos fue obtenida, esto permite continuar con la investigación ahora activando grupos funcionales como aminas o esteres para generar los derivados quelantes para la anhidrasa carbónica, como lo desarrollado para los derivados de triazol del tipo 6. Esta experiencia de estancia fue productiva que permitió adquirir e incrementar habilidades en la manipulación de reactivos, uso e interpretación de datos de técnicas analíticas como la resonancia magnética nuclear.

## Bibliografía/Referencias

- <sup>1</sup> Lindskog, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Therapeut.*, **1997**, *74*(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(96\)00198-2](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(96)00198-2)
- <sup>2</sup> Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*(12), 3467–3474. 9
- <sup>3</sup> Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J. Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators, **2004**, (1st ed.). CRC Press.
- <sup>4</sup> Topal, M., Gulcin, İ. *Turkish J. Chem.* **2014**, *38*: 5, 20.
- <sup>5</sup> Occhipinti, R., Boron, W. F. Role of *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*(15), 3841. 1
- <sup>6</sup> Vince, J. W., Reithmeier, R. A. F.. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*(43), 28430–28437.
- <sup>7</sup> Sterling, D., Reithmeier, R. A. F., Casey, J. R. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*(51), 47886–47894.
- <sup>8</sup> Sly, W. S., Hu, P. Y. *Annual Rev. Biochem.*, **1995**, *64*(1), 375–401.
- <sup>9</sup> Díez-Fernández, C., Rufenacht, V., Santra, S., Lund, A. M., Santer, R., Lindner, M., Tangeraas, T., Unsinn, C., de Lonlay, P., Burlina, A., van Karnebeek, C. D. M., Häberle, J. *Genet. Med.*, **2016**, *18*(10), 991–1000.
- <sup>10</sup> Christie, K. N., Thomson, C., Xue, L., Lucocq, J. M., Hopwood, D. *J. Hist. Cyt.*, **1997**, *45*(1), 35–40. 5
- <sup>11</sup> Crandall, E. D., O'Brasky, J. E. *J. Clin. Inv.*, **1978**, *62*(3), 618–622. 8
- <sup>12</sup> Soleimani, M., Aronson, P. S. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*(31), 18302–18308.
- <sup>13</sup> Tsuruoka, S., Swenson, E. R., Petrovic, S., Fujimura, A., Schwartz, G. J. *Am. J. Phys. Renal Phys.*, **2001**, *280*(1), F146–F154.
- <sup>14</sup> Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C. T. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **2004**, *14*(5), 667-702.
- <sup>15</sup> Potter, C. P. S., Harris, A. L. *Br. J. Cancer*, **2003**, *89*(1), 2-7.
- <sup>16</sup> Mboge, M. Y., Mahon, B. P., McKenna, R., Frost, S. C. *Metabolites*, **2018**, *8*(1), 19.
- <sup>17</sup> Chang, X., Han, J., Zhao, Y., Yan, X., Sun, S., Cui, Y. *BMC Musculoskeletal Disorders*, **2010**, *11*(1), 279. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-279>
- <sup>18</sup> Kida, E., Palmiello, S., Golabek, A. A., Walus, M., Wierzba-Bobrowicz, T., Rabe, A., Wisniewski, K. E. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **2006**, *65*(7), 664-674.
- <sup>19</sup> Ruusuvaari, E., Kaila, K. Carbonic Anhydrases and Brain pH in the Control of Neuronal Excitability **2014**, 271–290. In: Frost, S., McKenna, R. (eds) Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. Subcellular Biochemistry, 75. Springer, Dordrecht.
- <sup>20</sup> Cannella, R., Clerici, F., Gelmi, M. L., Penso, M., Pocar, D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*(5), 1854–1856.
- <sup>21</sup> López, J., Velazco-Cabral, I., Rodríguez-de León, E., Gómez, C. V., Delgado, F., Tamariz, J., Vázquez, M. A. *Org. Biomol.Chem.*, **2020**, *18*(3), 538-550.
- <sup>22</sup> N. Guttenberger, W. Blankenfeldt, R. Breinbauer, *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25*, 6149–6166. J. B. Laursen, J. Nielsen, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1663–1685. A. Chaudhary, J. M. Khurana, *Res. Chem. Intermed.* **2018**, *44*, 1045–1083.
- <sup>23</sup> H. X. Shi, W. T. Li, Q. Li, H. L. Zhang, Y. M. Zhang, T. B. Wei, Q. Lin, H. Yao, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 53439–53444. b) Y. Zhu, K. M. Gibbons, A. P. Kulkarni, S. A. Jenekhe, *Macromolecules* **2007**, *40*, 804–813. c) R. Bishop, *Am. Chem. Soc.* **2012**, *4*. D) D. Leibold, V. Lami, Y. J. Hofstetter, D. Becker-Koch, A. Weu, P. Biegger, F. Paulus, U. H. F. Bunz, P. E. Hopkinson, A. A. Bakulin, Y. Vaynzof, *Org. Electron.* **2018**, *57*, 285–291.

- 
- <sup>24</sup> S. R. Pour, A. Abdolmaleki, M. Dinari, *J. Mater. Sci.* **2019**, *54*, 2885–2896. D. He, Y. Wu, B. Q. Xu, *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 3703–3709.
- <sup>25</sup> F. Ferlin, P. M. Luque Navarro, Y. Gu, D. Lanari, L. Vaccaro, *Green Chem.* **2020**, *22*, 397–403
- <sup>26</sup> Otterlo, W. A. L. Van; Ngidi, E. L.; Kuzvidza, S.; Morgans, G. L.; Moleele, S. S.; Koning, C. B. *Tetrahedron* **2005**, *61* (42), 9996–10006.
- <sup>27</sup> Xu, C.; Yang, G.; Wang, C.; Fan, S.; Xie, L.; Gao, Y. *Molecules* **2013**, *18* (10), 11964–11977. Kidwai, M.; Saxena, S.; Khalilur, M.; Khan, R.; Thukral, S. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4295–4298.
- <sup>28</sup> Gao, S.; Tsai, C. H.; Tseng, C.; Yao, C. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9143–9149
- <sup>29</sup> Xia, L.; Cai, H.; Lee, Y. R. *Tetrahedron* **2015**, *71* (38), 6894–6900
- <sup>30</sup> Kumar, D.; Reddy, V. B.; Sharad, S.; Dube, U.; Kapur, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (9), 3805–3809
- <sup>31</sup> Gohil, J.; Patel, M. R. *Soc. Chem.* **2016**, *1* (0), 1–9
- <sup>32</sup> Galván, A. Dominguez, J. M., Rosales, M. Vazquez, M. A., *New J. Chem.* **2023**, *47*, 17, 8258-8267
- <sup>33</sup> Panda, S.; Pradhan, N.; Chatterjee, S.; Morla, S.; Saha, A.; Roy, A.; Kumar, S.; Bhattacharyya, A.; Manna, D. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18455.
- <sup>34</sup> Asemanipoor, N.; Mohammadi-Khanaposhtani, M.; Moradi, S.; Vahidi, M.; Asadi, M.; Faramarzi, M. A.; Mahdavi, M.; Biglar, M.; Larijani, B.; Hamedifar, H.; Hajimiri, M. H. *Bioorg. Chem.* **2020**, *95*, 103482
- <sup>35</sup> Hussain, M.; Qadri, T.; Hussain, Z.; Saeed, A.; Channar, P. A.; Shehzadi, S. A.; Hassan, M.; Larik, F. A.; Mahmood, T.; Malik, A. *Heliyon* **2019**, *5*, e02812.
- <sup>36</sup> Wang, L., Tang, Y. Intermolecular 1,3-Dipolar Cycloadditions of Alkenes, Alkynes, and Allenes. **2014**, En Elsevier eBooks, 1342-1383.
- <sup>37</sup> Ganeshpurkar, A., Kumar, D., Singh, S. K. *Curr. Org. Synth.*, **2018**, *15*(2), 154-165.