

Diversos Enfoques en la Síntesis y Modelado Computacional de Estructuras Conteniendo el Núcleo de Quinolona

Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas



Licenciada en Química
Ivana Malvacio



Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba, Dpto. Química Orgánica, Fac. Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba y Dpto. Química, Fac. Cs. Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Diversos Enfoques en la Síntesis y Modelado Computacional de Estructuras Conteniendo el Núcleo de Quinolona

Directores de Tesis:

- **Prof. Dra. E. Laura Moyano**
- **Prof. Dr. D. Mariano A. Vera**

Comisión de Tesis:

- **Prof. Dra. M. Cecilia Carpinella**
- **Prof. Dra. M. Teresa Baumgartner**
- **Prof. Dr. M. Alfredo Quevedo**



A mis Padres...

“Una tesis es como una partida de ajedrez, tiene cierto número de movimientos, pero desde el principio hay que estar capacitado para predecir los movimientos a efectuar con vistas a dar jaque mate al adversario.”

Umberto Eco

Agradecimientos

*“Cuando la gratitud es tan absoluta
las palabras sobran”*

Alvaro Mutis

No quisiera concluir esta etapa sin agradecer a TODOS los que han aportado su granito de arena para permitirme llegar al final de esta historia.

En primer lugar, quisiera agradecer a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis. A la Universidad Nacional de Córdoba y en particular a la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme una educación gratuita y de calidad. Al INFIQC y al Dpto. de Química Orgánica por darme el espacio para llevar a cabo este trabajo. A CONICET, por el financiamiento otorgado en estos años.

A mis directores por aceptarme como tesista y confiar en mí para realizar este proyecto. A la comisión de tesis por el seguimiento y por dedicar parte de su tiempo a la lectura y corrección del trabajo. A todas las personas que me han transmitido su conocimiento y experiencia y que han aportado a mi educación y desarrollo profesional.

A los compañeros del lab 001 y del MMS, por su calidad humana, porque hicieron que el trabajo sea mucho más ameno. Por brindarme siempre todo el apoyo y la ayuda necesaria para seguir adelante. Por la complicidad, la solidaridad y el buen humor para empezar cada día.

A los amigos, incluyendo los de la facu que compartieron conmigo la carrera de grado y a los que me han acompañado durante todo el Doctorado. A los que conocí a lo largo de estos años en este y otros Departamentos, con quienes compartí tantas alegrías. Gracias por los momentos vividos, por las charlas de pasillo, los mates, los asados, por la buena onda, por todas las anécdotas y recuerdos que quedarán grabados en mi corazón y que nunca voy a olvidar. Tampoco puedo dejar de agradecer a quienes estando lejos de mi país, me hicieron sentir como en casa.

A los que forman parte de mi círculo más cercano, y a los que en algún momento formaron parte de ese grupo y que distintas razones de la vida ya no están tan presentes. A ellos, quiero agradecerles por soportar mis locuras, por su paciencia, por escucharme, por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles, por el amor y el cariño que me brindan y sobre todo, por hacerme feliz.

Y por último, pero no por eso menos importante, quiero agradecer a mi familia. Por estar SIEMPRE presente, por acompañarme en todas las etapas, por apoyarme incondicionalmente en todas mis decisiones, por inculcarme los grandes valores de la vida, por enseñarme a ser fuerte ante las adversidades, por el amor de cada día. Porque si soy lo que soy, es gracias a ellos. Porque si llegué hasta acá, también es gracias a ellos.

A todos y cada uno de ustedes... muchas **GRACIAS!**

INDICE DE CONTENIDOS

PRÓLOGO.....	I
RESUMEN	III
ABREVIATURAS	V

PARTE I: QUINOLONAS

CAPÍTULO 1: SÍNTESIS DE 3-CARBOETOXI-QUINOLIN-4-ONAS Y DERIVADOS

1.1. Introducción	3
1.1.1. Importancia biológica del núcleo de quinolona	3
1.1.2. La irradiación de microondas como alternativa sintética	4
1.1.2.a. <i>Fundamentos de la irradiación por microondas</i>	5
1.1.2.b. <i>Propiedades dieléctricas de los materiales</i>	8
1.1.2.c. <i>Calentamiento por microondas y calentamiento convencional</i>	9
1.1.2.d. <i>Equipamiento y métodos disponibles</i>	11
1.1.3. Antecedentes de la síntesis de quinolonas	12
1.2. Objetivos específicos	14
1.3. Síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas	15
1.3.1. Optimización de la síntesis asistida por microondas	15
1.3.2. Comparación de metodologías: Microondas vs. Convencional	20
1.3.3. Síntesis convencional y asistida por microondas de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas	21
1.4. Derivatización de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas	22
1.4.1. Síntesis de 3-carboxi-quinolin-4-onas	23
1.4.2. Síntesis de 3-(<i>N</i> -bencil)carboxamida-quinolin-4-onas	24
1.5. Sección experimental	25
1.5.1. Metodología convencional	26
1.5.1.a. <i>Síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas</i>	26
1.5.2. Síntesis asistida por microondas	27
1.5.2.a. <i>Síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas</i>	27
1.5.2.b. <i>Síntesis de 3-carboxi-quinolin-4-onas</i>	27
1.5.2.c. <i>Síntesis de 3-(N-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas</i>	28
1.6. Conclusiones	28
1.7. Referencias bibliográficas	29

CAPÍTULO 2: SÍNTESIS DE QUINOLIN-4-ONAS POR FVP. ESTUDIO DEL MECANISMO DE REACCIÓN EN FASE GASEOSA

2.1. Introducción	37
2.1.1. La reacción de Gould-Jacobs	37
2.1.2. Reacciones térmicas	40
2.1.2.a. <i>Orígenes de las reacciones térmicas</i>	40
2.1.2.b. <i>Tipos de reacciones térmicas</i>	41
2.1.3. Características y aplicaciones de la <i>Flash Vacuum Pyrolysis</i> (FVP)	43
2.1.3.a. <i>Diseño experimental</i>	43
2.1.3.b. <i>Características</i>	44
2.1.3.c. <i>Principales reacciones</i>	45
2.1.4. Métodos computacionales para el estudio de mecanismos	50
2.1.4.a. <i>Density Functional Theory</i> (DFT)	51
2.1.4.b. <i>Coupled Cluster</i> (CC)	53
2.2. Objetivos específicos	55
2.3. <i>Flash Vacuum Pyrolysis</i> (FVP) de fenilaminometilenmalonatos de dietilo para la síntesis de quinolin-4-onas	55
2.3.1. Optimización de las condiciones	55
2.3.2. Reacciones de ciclización de fenilaminometilenmalonatos de dietilo	56
2.4. Estudio teórico del mecanismo de formación de quinolin-4-onas en fase gaseosa	58
2.4.1. Etapa 1: formación de fenilaminometilenmalonatos de dietilo	58
2.4.2. Etapa 2: formación de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas y quinolin-4-onas	59
2.4.3. Análisis comparativo de ambas vías de reacción de la Etapa 2	69
2.5. Metodología	71
2.5.1. <i>Flash Vacuum Pyrolysis</i> (FVP)	71
2.5.2. Métodos computacionales	72
2.6. Conclusiones	73
2.7. Referencias bibliográficas	74

PARTE II: PIRAZOLOQUINOLONAS

CAPÍTULO 3: SÍNTESIS DE PIRAZOLO[4,3-*c*]QUINOLIN-3-ONAS

3.1. Introducción	85
3.1.1. Importancia biológica del núcleo de pirazoloquinolinona	85

3.1.2. Antecedentes de la síntesis de pirazoloquinolinonas	86
3.2. Objetivos específicos	91
3.3. Síntesis de pirazolo[4,3-<i>c</i>]quinolin-3-onas	91
3.3.1. Optimización de la síntesis asistida por microondas	91
3.3.1.a. <i>Evaluación de la vía directa</i>	91
3.3.1.b. <i>Sustitución de calentamiento convencional por microondas</i>	93
3.3.2. Síntesis convencional y asistida por microondas de pirazolo[4,3- <i>c</i>] quinolin-3-onas	94
3.4. Sección experimental	95
3.4.1. Metodología convencional	96
3.4.2. Síntesis asistida por microondas	97
3.5. Conclusiones	98
3.6. Referencias bibliográficas	98
CAPÍTULO 4: MODELADO COMPUTACIONAL DE PIRAZOLO[4,3-<i>c</i>]QUINOLIN-3-ONAS EN EL SITIO ACTIVO DE LA QUINASA CHECKPOINT 1 (CHK1). ENSAYO <i>IN VITRO</i> DE ACTIVIDAD INHIBITORIA.	
4.1. Introducción	105
4.1.1. Aspectos generales de la Química Medicinal	105
4.1.1.a. <i>Estrategias en la búsqueda de nuevos fármacos</i>	106
4.1.2. La Química Computacional en el diseño de fármacos	107
4.1.2.a. <i>Cálculos de Mecánica Molecular (MM)</i>	109
4.1.2.b. <i>Simulaciones de docking</i>	110
4.1.2.c. <i>Simulaciones de Dinámica Molecular (DM)</i>	112
4.1.3. Inhibición de la quinasa <i>Checkpoint 1</i> (Chk1) para el tratamiento del cáncer	114
4.1.3.a. <i>Función y regulación de la Chk1</i>	114
4.1.3.b. <i>Estructura de la Chk1</i>	116
4.1.3.c. <i>Inhibidores de referencia de la Chk1</i>	118
4.2. Objetivos específicos	120
4.3. Simulaciones de <i>docking</i> de pirazolo[4,3-<i>c</i>]quinolin-3-onas en la Chk1	121
4.3.1. Resultados preliminares con <i>Autodock 4.0</i>	121
4.3.2. <i>DockBench</i> : plataforma informática para la validación de protocolos de <i>docking</i> y desarrollo de <i>virtual screening</i>	122
4.3.3. <i>Docking</i> de pirazolo[4,3- <i>c</i>]quinolin-3-onas con GOLD 5.2	128

4.4. Simulaciones de dinámica molecular de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas en la Chk1	133
4.4.1. Simulaciones de dinámica molecular <i>post-docking</i>	133
4.4.2. Simulaciones de dinámica molecular supervisada	137
4.5. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i>	145
4.5.1. Ensayos de la actividad inhibitoria de Chk1 por pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas	145
4.6. Actividad <i>in vitro</i> vs. simulaciones computacionales	145
4.7. Metodología	147
4.7.1. Simulaciones de <i>docking</i> con <i>Autodock 4.0</i>	147
4.7.2. Desarrollo de <i>DockBench 1.0</i>	148
4.7.3. Simulaciones de <i>docking</i> con <i>Gold 5.2</i>	149
4.7.4. Simulaciones de dinámica molecular <i>post-docking</i> y utilizando <i>SuMD</i>	149
4.7.5. Ensayos de actividad en la quinasa Chk1	151
4.8. Conclusiones	152
4.9. Referencias bibliográficas	154
Conclusiones generales y proyecciones	161
ANEXO – CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS	IX

El núcleo de quinolona ha sido muy estudiado por diversos grupos de investigación a nivel mundial. El interés en esta estructura se fundamenta en su amplio espectro terapéutico, principalmente como antimalárico y antibacteriano. Además, el anillo de quinolona constituye el núcleo base de moléculas bioactivas más complejas que presentan distintas actividades farmacológicas.

A pesar de ser ampliamente estudiado, aún queda mucho por explorar y descubrir en el mundo de las quinolonas. En consecuencia, uno de los objetivos primordiales que se plantean en esta tesis es ampliar el conocimiento en cuanto a las metodologías que permitan acelerar el proceso de síntesis de estos compuestos y el descubrimiento de nuevas estructuras con actividad biológica.

La originalidad de este trabajo radica en el estudio de núcleos de quinolonas realizado desde diferentes aspectos y áreas del conocimiento, partiendo de su síntesis, incluyendo la comprensión detallada del mecanismo de formación, hasta su actividad como antimaláricos. Se destaca además, la derivatización de los grupos funcionales contenidos en el anillo de quinolona para mejorar sus propiedades farmacológicas y la fusión con el anillo de pirazol para su posible aplicación como inhibidores de la proteína *Checkpoint kinase 1* (Chk1), utilizados en terapias oncogénicas. En este trabajo integral también se destaca el aporte del modelado computacional al estudio de las interacciones fármaco-receptor.

La presente tesis se encuentra dividida en dos partes y cada una de ellas consta de dos capítulos. La primera parte (Parte I), se focaliza en los núcleos de quinolonas y se plantean como objetivos generales: la síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas y derivados, aplicando tanto la metodología convencional como la síntesis alternativa con microondas (Capítulo 1) o *Flash Vacuum Pyrolysis* (Capítulo 2). Teniendo en cuenta los resultados de ésta última, se plantea además un estudio teórico del mecanismo en fase gaseosa de la reacción de Gould-Jacobs que conduce a la formación de los núcleos de quinolonas (Capítulo 2). En la segunda parte (Parte II), el estudio se centra sobre estructuras de pirazoloquinolinonas, conteniendo el anillo de quinolona sintetizado en la Parte I. Entre los objetivos generales de esta parte se encuentra la síntesis de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas, aplicando tanto la metodología convencional como la síntesis alternativa asistida por microondas (Capítulo 3). Además, se plantea un estudio, mediante modelado molecular, del potencial de estos ligandos con estructura de pirazoloquinolinona como inhibidores de la quinasa Chk1, con el fin último de seleccionar los mejores candidatos de la quimioteca para la evaluación de su actividad inhibitoria *in vitro* (Capítulo 4).

Por último, cabe destacar que esta tesis ha sido el fruto de cuatro años de investigación y aprendizaje en el marco de un proyecto interdisciplinario en el que es importante destacar la participación de los directores: Prof. Dra. Laura Moyano y Prof. Dr. Mariano Vera; y en el que es imprescindible resaltar la colaboración del Dr. David N'Da, de la Universidad de Potchefstroom, Sudáfrica, por los ensayos de actividad antimalárica, y del Prof. Dr. Stefano Moro de la Universidad de Padova, Italia, en lo que concierne a las simulaciones computacionales de interacción fármaco-receptor.

Resumen

En este trabajo de tesis doctoral se abordó el estudio teórico-experimental de estructuras conteniendo el núcleo de quinolona.

En una primera instancia, se sintetizaron trece compuestos de estructura 3-carboetoxi-quinolin-4-onas aplicando la metodología de calentamiento convencional y/o irradiación por microondas. Los rendimientos obtenidos fueron moderados a excelentes con ambas metodologías empleadas, aunque la irradiación con microondas presentó la ventaja de reducir los tiempos de reacción de horas a minutos. A partir de estas quinolin-4-onas se sintetizaron nueve derivados 3-carboxi-quinolin-4-onas mediante hidrólisis en medio básico del grupo éster, obteniéndose rendimientos excelentes, y cuatro derivados 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas con rendimientos moderados a excelentes. Posteriormente, la quimioteca de quinolonas fue enviada a la Universidad de Potchefstroom, Sudáfrica, para su evaluación como posibles antimaláricos.

Con el fin de estudiar el proceso de ciclización que conduce a la formación de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas, estos compuestos también fueron sintetizados mediante pirólisis en fase gaseosa (*Flash Vacuum Pyrolysis*). En estas reacciones se observó además, el producto proveniente de la descarboxilación de 3-carboetoxi-quinolin-4-ona. Estos resultados experimentales impulsaron el estudio detallado del mecanismo de reacción, mediante cálculos computacionales a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) y CCSD(T)/6-311G(d,p), que permitiera explicar la formación de ambos productos a partir de anilina y etoximetilmalonato de dietilo.

En la segunda parte de la tesis, se sintetizaron treinta compuestos de estructura pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas a partir de las 3-carboetoxi-quinolin-4-ona obtenidas previamente. Los rendimientos logrados empleando calentamiento convencional y/o irradiación de microondas fueron buenos a excelentes.

Finalmente, se utilizó modelado computacional para seleccionar los mejores candidatos de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas a ser evaluados como inhibidores de la quinasa *Checkpoint 1* (Chk1) mediante ensayos *in vitro*. Para ello, se desarrolló la plataforma informática *DockBench 1.0* que permitió seleccionar el mejor protocolo de *docking* y la estructura cristalográfica de la proteína más adecuada de manera automatizada. Utilizando simulaciones de *docking* se identificaron las principales interacciones de las pirazoloquinolinonas con los residuos del sitio activo de Chk1. Mediante simulaciones de dinámica molecular supervisada se estudió el proceso de reconocimiento ligando-receptor, utilizando un algoritmo implementado recientemente por el grupo del Prof. Stefano Moro de la Universidad de Padova, Italia; además de evaluar la evolución del sistema en el tiempo una vez unido el ligando al sitio activo, mediante simulaciones de dinámica molecular clásica.

Si bien las simulaciones computacionales estimaban que los anillos de pirazoloquinolinonas eran promisorios inhibidores de Chk1, el ensayo *in vitro* de actividad mostró que las mismas no presentan la actividad esperada. Luego de obtener estos resultados, un análisis más exhaustivo de los cálculos computacionales demostró que las interacciones electrostáticas y principalmente la formación de puentes de hidrógeno, serían fundamentales para la unión efectiva de estos ligandos.

ABREVIATURAS

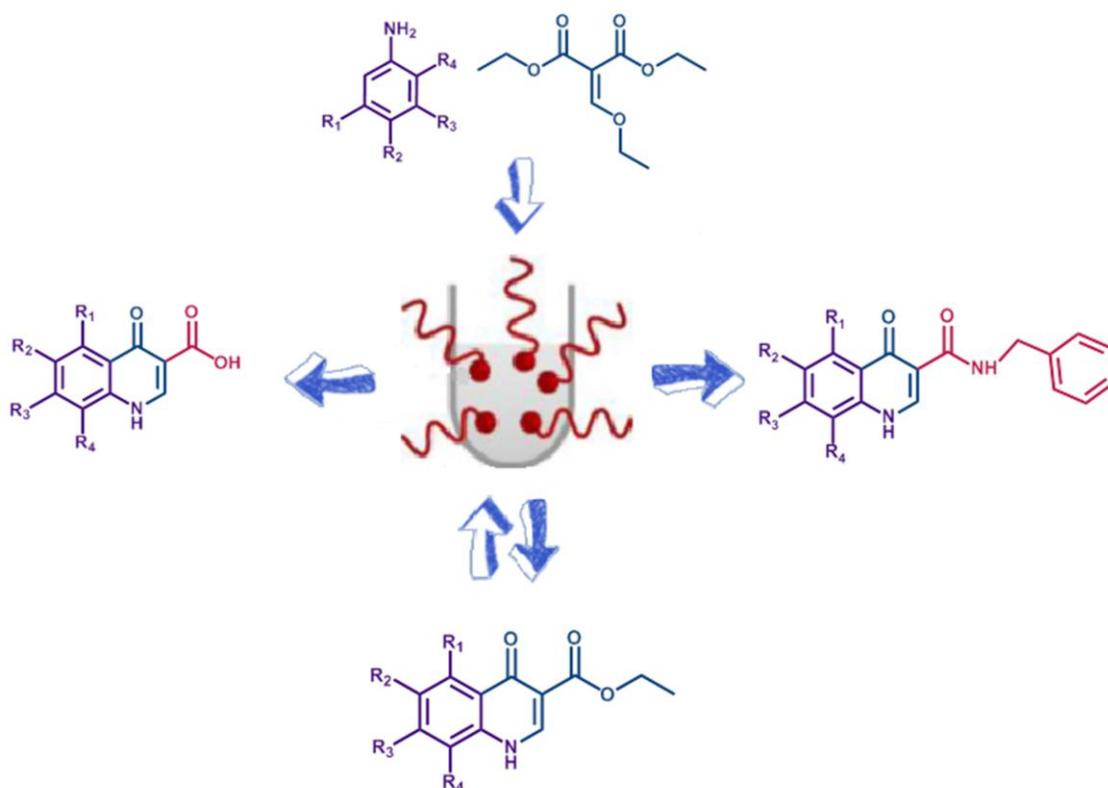
A	Factor pre-exponencial en la ecuación de Arrhenius.
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated kinase</i>
ATP	Adenosín trifosfato
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
B3LYP	Funcional híbrido, combinando el funcional de Becke (B3) y funcional de correlación de Lee-Yang-Parr (LYP).
BZR	Receptor de las benzodiazepinas
°C	Grados Celsius
CAM-B3LYP	Funcional híbrido, combinando B3LYP y la corrección de largo alcance (<i>Coulomb-attenuating method</i>).
CAAD	Diseño de fármacos asistidos por computadoras (<i>Computer Assisted Drug Design</i>)
CC	<i>Coupled Cluster</i> .
CCSD	Métodos CC teniendo en cuenta excitaciones simples y dobles (<i>Coupled Cluster Singles and Doubles</i>).
CCSD(T)	Métodos CC teniendo en cuenta excitaciones simples, dobles y triples
CdC25	<i>Cell division Cycle 25</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CG-EM	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CPU	Unidad de procesamiento central (<i>Central Processing Unit</i>)
¹³C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
DA	Diels-Alder
DCB	1,2-diclorobenceno
DFE	Difenil éter
DFT	Teoría del funcional de la densidad (<i>Density Functional Theory</i>)
DIPEA	Diisopropiletilamina
DM	Dinámica Molecular
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
E_a	Energía de activación
E_{ele}	Energía electrostática
EMME	Etoximetilenmalonato de dietilo
EtOH	Etanol

VI Abreviaturas

E_{tot}	Energía total
eV	Electronvoltio
E_{VdW}	Energía de Van der Waals
ε'	Constante dieléctrica de un material
ε''	Pérdida dieléctrica de una sustancia
FA	3-(fenilamino)acrilato
FCI	Interacción de configuración completa (<i>Full Configuration Interaction</i>)
FVP	Pirólisis en fase gaseosa (<i>Flash Vacuum Pyrolysis</i>)
Ψ	Función de onda
GGA	Métodos de gradiente generalizado (<i>Generalized Gradient Approximations</i>)
G-J	Gould-Jacobs
GPU	Unidad de procesamiento gráfico (<i>Graphics Processing Unit</i>)
GUI	Interfaz gráfica para el usuario (<i>Graphical User Interface</i>)
HBTU	<i>o</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronium hexafluorofosfato
HF	Hartree-Fock
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
IR	Espectroscopía Infrarroja
IRC	Coordenada intrínseca de reacción (<i>Intrinsic Reaction Coordinate</i>)
J	Constante de acoplamiento en RMN
LBVS	Cribado virtual basado en el ligando (<i>Ligand-based Virtual Screening</i>)
LDA	Aproximación de la densidad local (<i>Local Density Approximation</i>)
λ	Longitud de onda
M	Fenilaminometilenmalonato de dietilo
MAOS	Síntesis Orgánica Asistida por Microondas (<i>Microwave Assisted Organic Synthesis</i>)
MM	Mecánica Molecular
MO	Microondas
v	Frecuencia
PDB	Base de datos de proteínas - <i>Protein Data Bank</i>
ppm	Partes por millón
PQ	Pirazolo[4,3- <i>c</i>]quinolin-3-ona
PQd	Pirazolo[4,3- <i>c</i>]quinolin-3-onas utilizadas en el estudio de <i>docking</i>
Q	3-carboetoxi-quinolin-4-ona

Q'	Quinolin-4-ona
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad (<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>)
R	Resolución en Å de una estructura cristalográfica
RDA	Retro Diels-Alder
R-GABA_A	Complejo receptor del ácido γ -aminobutírico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media (<i>Root-mean-square deviation</i>)
RMSF	Fluctuación cuadrática media (<i>Root Mean Square Fluctuation</i>)
ρ	Densidad electrónica
SBVS	Cribado virtual basado en la estructura (<i>Structure-based Virtual Screening</i>)
SIF	Perfiles de interacción estructural (<i>Structure Interaction Fingerprints</i>)
SuMD	Dinámica Molecular Supervisada (<i>Supervised Molecular Dynamics</i>)
T	Temperatura
t	Tiempo
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en placa delgada (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TS	Estado de transición (<i>Transition State</i>)
τ	Tiempo de contacto en la reacción de FVP
tan δ	Tangente de pérdida dieléctrica
VS	Cribado virtual (<i>Virtual Screening</i>)
W	Vatio (<i>watt</i>)

Síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas y derivados



1.1.1. Importancia biológica del núcleo de quinolona

Las quinolonas son compuestos heterocíclicos aromáticos derivados del núcleo de quinolina y pueden ser tanto de origen sintético como natural. Las quinolonas, como su nombre lo indica, presentan un grupo cetona en su estructura. En esta tesis, se estudiaron en particular los núcleos de quinolin-4-onas, es decir, conteniendo el grupo cetona en la posición 4 del anillo de quinolina. La presencia de un grupo amino en la misma molécula da lugar al equilibrio tautomérico mostrado en la Figura 1.1. Cabe destacar que algunos textos utilizan la denominación quinolona o quinolina indistintamente debido a la presencia del mencionado equilibrio; mientras que otros, utilizan uno u otro término para hacer referencia al tautómero ceto o enol, respectivamente.

La primera quinolina de origen natural fue la quinina (Figura 1.2), aislada a partir de corteza de *Cinchona* y utilizada por los nativos americanos por sus propiedades curativas. Desde entonces, muchos otros derivados fueron obtenidos a partir de fuentes naturales, en particular 2 y 4-quinolonas, las cuales son la estructura fundamental de muchos alcaloides.¹

En el año 1934 Andersag y su equipo descubrieron la cloroquina (Figura 1.2) en los laboratorios Bayer, la cual fue ignorada durante una década ya que se pensaba que era demasiado tóxica para el ser humano. Sin embargo, durante la Segunda Guerra Mundial, científicos británicos y estadounidenses la reconocieron como una droga efectiva y segura para el tratamiento de la malaria.²

Durante años continuó la investigación de estos compuestos y otros relacionados estructuralmente como las 1,8-naftiridonas, resultando en el descubrimiento del ácido nalidíxico en 1962 (Figura 1.2),³ el cual fue la primera quinolona de uso clínico utilizada para el tratamiento de infecciones urinarias. Este hecho condujo al desarrollo de nuevas generaciones de antibióticos basados en estructuras de quinolonas. Entre las más importantes cabe destacar las fluoroquinolonas, las cuales, debido a la adición de un sustituyente flúor en posición 6, han extendido su espectro terapéutico además de aumentar sus propiedades farmacocinéticas.¹ El desarrollo de fluoroquinolonas como norfloxacin y ciprofloxacina (Figura 1.2), algunos de los antibióticos más prescritos en el mundo, extendieron el espectro de actividad contra infecciones causadas por

1.1.

Introducción

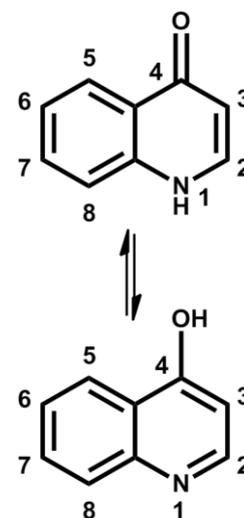
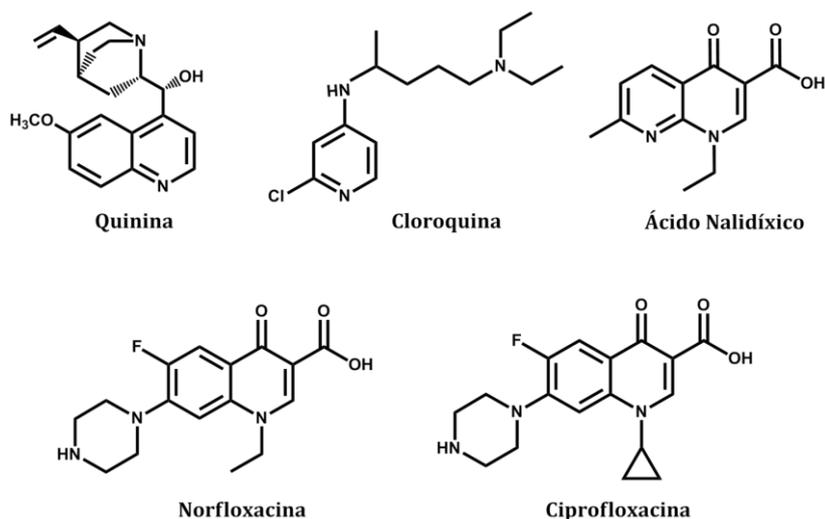


Figura 1.1.

Tautomerismo presente en núcleos de quinolin-4-ona.

Figura 1.2.
Estructuras de interés medicinal.



organismos resistentes como *Pseudomonas aeruginosa* y patógenos aeróbicos y anaeróbicos Gram-positivos.^{1,4}

Debido a la utilidad clínica que presentan, se han desarrollado metodologías sintéticas que permiten obtener diferentes análogos de dichos núcleos con mejores propiedades terapéuticas. En este sentido, es importante destacar los trabajos realizados por Conrad y Limpach (1887)⁵ y posteriormente por Gould y Jacobs (1939),⁶ quienes fueron los pioneros en la síntesis de quinolonas.

Actualmente existen cuatro generaciones de quinolonas utilizadas principalmente en infecciones de los tractos genitourinario y gastrointestinal y en infecciones ginecológicas, respiratorias y enfermedades de transmisión sexual entre otras.⁷

1.1.2. La irradiación de microondas como alternativa sintética

La Química Orgánica es una de las ciencias que contribuye a la mejora de la calidad de vida y bienestar de la humanidad, ideando soluciones en diferentes campos como son la salud y los nuevos materiales, entre otros. Sin embargo, existen innumerables reacciones en las cuales se llevan a cabo procedimientos poco ecológicos y, por consiguiente, perjudiciales para el medio ambiente y la salud. Como consecuencia de estas preocupaciones, una nueva filosofía ha surgido dentro del mundo de la química, la denominada **Química Verde** o **Química Sostenible**. La Química Verde se basa en una serie de principios, propuestos

por Anastas y Warner (Figura 1.3),⁸ orientados hacia el diseño de productos y procesos químicos que impliquen la utilización de materiales de partida naturales, biodegradables y renovables, reactivos inocuos, condiciones de reacción menos dañinas para el medio ambiente y reducción de residuos. Si bien es imposible cumplir simultáneamente los doce principios postulados, estos constituyen una guía general para orientar la investigación hacia metodologías más sostenibles.

En la búsqueda de una química menos contaminante, en los últimos años diversas técnicas energéticas más ecológicas que las convencionales han sido desarrolladas de forma exitosa; entre ellas podemos mencionar: la electroquímica, la fotoquímica, la sonoquímica y la radiación por microondas (MO). Si bien la más utilizada de todas ellas en síntesis orgánica es la irradiación con MO, aún quedan dudas acerca de lo “amigable con el medio ambiente” de esta técnica, particularmente en cuestión a la eficiencia energética. Calcular el consumo energético de una reacción calentada por MO es mucho más complicado de lo que se piensa. En primer lugar, la potencia leída directamente del instrumento no puede ser aplicada como tal para este cálculo ya que solo el 50 % de la energía eléctrica usada es convertida a energía de MO y, en segundo lugar, no todas las MO generadas son absorbidas por la muestra. Se ha demostrado que las reacciones realizadas a escala laboratorio en un reactor monomodo son ineficientes energéticamente. Sin embargo, la irradiación con MO se vuelve energéticamente más favorable que el calentamiento convencional cuando se pasa de escala laboratorio (mg) a escala industrial (kg) y de un reactor monomodo a un multimodo.⁹

A pesar de lo expuesto anteriormente acerca de la eficiencia energética de la Síntesis Orgánica Asistida por Microondas (MAOS por sus siglas en inglés, *Microwave Assisted Organic Synthesis*), ésta técnica, utilizada por primera vez en 1986 por los investigadores Gedye y Giguere,^{10,11} continúa siendo ampliamente utilizada ya que ha permitido un incremento significativo de los rendimientos, la ausencia de solvente o empleo de solventes más inocuos y la disminución de los tiempos de reacción.

1.1.2.a. Fundamentos de la irradiación por microondas

Las MO son ondas electromagnéticas que se encuentran en el rango de frecuencias (ν) de 0,3 a 300 GHz, lo cual



Figura 1.3. Principios de la Química Verde.

corresponde a longitudes de onda (λ) de 1 mm a 1 m. Dentro del espectro electromagnético, la región de MO se ubica entre las radiaciones de infrarrojo y las radiofrecuencias. Los hornos de MO domésticos y de laboratorio de nuestro país, generalmente trabajan a 2,45 GHz ($\lambda = 12,25$ cm) para evitar interferencias con la banda de frecuencia de las telecomunicaciones y otros equipamientos (Figura 1.4.a). Cabe destacar que la energía de un fotón de esta frecuencia es de aproximadamente 1×10^{-5} eV, la cual es demasiado baja para producir rupturas de enlaces. Por lo tanto, las reacciones no son causadas por la absorción directa de la radiación como ocurre con la radiación ultravioleta y visible (reacciones fotoquímicas), sino que la química de MO se basa en los efectos del **calentamiento dieléctrico**.¹²⁻¹⁵

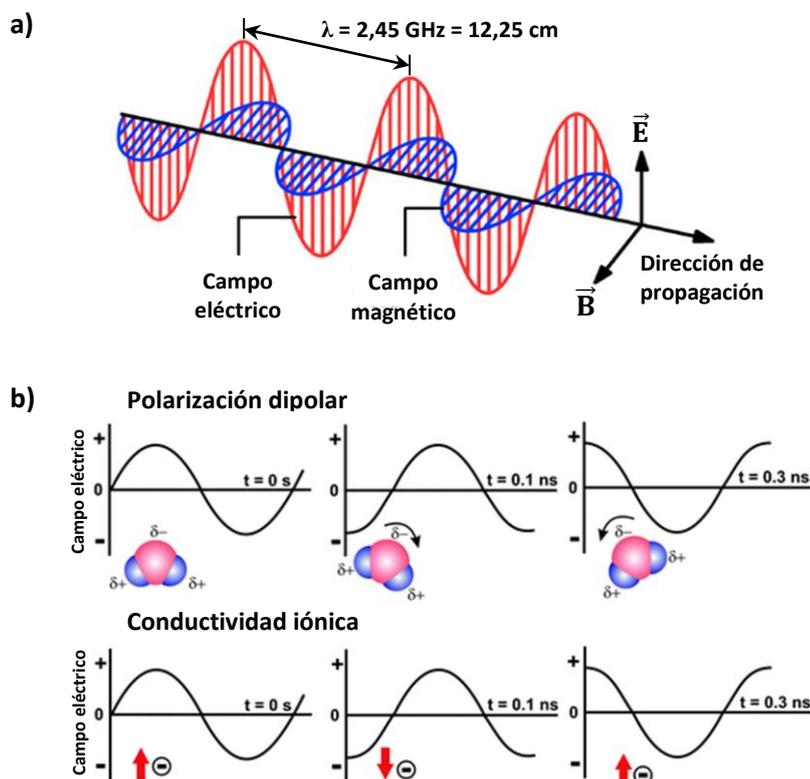
En la mayoría de los procesos involucrados en la MAOS, la componente eléctrica es la que interactúa principalmente con la materia, a pesar de que en algunos casos las interacciones con el campo magnético resultan también de importancia.^{16,17} La componente eléctrica de la onda electromagnética puede producir calentamiento mediante dos mecanismos: **polarización dipolar** y **conductividad iónica** (Figura 1.4.b).^{12,13,18} Para el primer proceso, las moléculas deben tener un momento dipolar para absorber

Figura 1.4.

a) Componente eléctrica y magnética de una microonda.

b) Mecanismo de polarización dipolar (arriba) y de conductividad iónica (abajo).

Figura adaptada de ref. 18.



MO. Cuando son irradiadas, los dipolos tienden a alinearse con el campo eléctrico de la onda, pero como éste es oscilante, se producen alineaciones y re-alineaciones secuenciales que generan fricción molecular y pérdida dieléctrica (véase $\tan \delta$ en la próxima sección). Como resultado de este proceso se genera una cantidad de calor que depende tanto de la capacidad de las moléculas de alinearse, como de la frecuencia de oscilación de la onda. Si el dipolo no tiene tiempo de re-alinearse (radiación de alta frecuencia) o retorna a su orientación inicial antes de que oscile el campo eléctrico (radiación de baja frecuencia) no se produce calentamiento.^{12,13}

El valor de 2,45 GHz se encuentra entre estos extremos, siendo una radiación apropiada para la mayoría de las matrices que se utilizan. Es importante resaltar que el fenómeno de calentamiento no involucra en absoluto transiciones rotacionales cuantizadas, y por lo tanto la absorción es un fenómeno colectivo de la masa o matriz irradiada y no de las moléculas aisladas. Debe tenerse en cuenta que los gases no pueden ser calentados por las MO ya que las distancias entre moléculas es muy larga y no existe fricción. De manera similar, el hielo es muy poco absorbente porque las moléculas dipolares de agua se encuentran confinadas en una red cristalina y no poseen movimiento libre como en el estado líquido.^{12,13}

Por otra parte, el mecanismo de **conducción iónica** depende de la presencia de iones en la matriz que, al ser partículas cargadas, oscilan por la influencia del campo eléctrico de la onda colisionando con las moléculas y átomos vecinos. Estos choques causan agitación o movimientos que producen calor pero la cantidad generada es menor a la que se produce por el mecanismo de polarización dipolar por lo que se lo considera un proceso secundario.

Existe también un tercer mecanismo que actúa en materiales conductores o semiconductores como son los metales (**polarización interfacial**). Cuando una onda oscilante interacciona con el material, se induce un campo eléctrico generando movimiento o flujo de los electrones en las interfaces del mismo. Dado que estas partículas cargadas tienen una libertad de traslación limitada, se produce una resistencia y consecuentemente se libera una importante cantidad de energía en este proceso. Este mecanismo es importante en las síntesis que involucran películas delgadas de metales como Pd o Au,¹⁹ o soportes de grafito.¹²

1.1.2.b. Propiedades dieléctricas de los materiales

A partir de lo expuesto en la sección previa resulta comprensible que el principal factor involucrado en el calentamiento por MO sea la capacidad del material expuesto a la radiación de interactuar con ella, es decir, de las propiedades dieléctricas del mismo. La capacidad de una sustancia de convertir la energía electromagnética en energía térmica se determina por la tangente de pérdida dieléctrica ($\tan \delta$)^{12,13} que se define:

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad \text{Ec. 1.1.}$$

donde ϵ'' es la pérdida dieléctrica de la sustancia, que indica la eficiencia con la cual la radiación es convertida en calor y ϵ' es la constante dieléctrica del material, que describe la polarizabilidad de las moléculas en el campo eléctrico. Para que ocurra una absorción eficiente y un rápido calentamiento, se requieren valores altos de $\tan \delta$. En general, los solventes se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades absorbentes como: de alta absorción ($\tan \delta > 0,5$), de absorción media ($0,5 > \tan \delta > 0,1$) y de baja absorción ($\tan \delta < 0,1$). En la Tabla 1.1 se encuentran algunos solventes con sus respectivos valores de $\tan \delta$.¹³

Es importante tener en cuenta que todas las sustancias en la mezcla, y no sólo el solvente, son responsables de la absorción de las MO y, por ello, de acuerdo a los reactivos o aditivos que se utilicen, se podrá lograr un eficiente calentamiento aún en presencia de solventes de muy baja absorción.

El valor de $\tan \delta$ de las sustancias es dependiente tanto de la frecuencia de trabajo como de la temperatura. Por ejemplo, a medida que el agua aumenta su temperatura decrece su constante dieléctrica ϵ' . Por su parte ϵ'' alcanza un máximo a un valor de frecuencia de aproximadamente 18 GHz, al cual la penetración de la onda es muy baja porque la absorción es tan eficiente que las ondas sólo alcanzan el nivel superficial de la mezcla. Es por esto que los reactores utilizados en síntesis así como también los hornos de MO domésticos utilizan una frecuencia más baja logrando un calentamiento uniforme desde el seno de la mezcla (este proceso se explica detalladamente en la siguiente sección).

Los reactores utilizados en los equipos de MO están contruidos de vidrio borosilicato o cuarzo por tratarse de materiales con bajos valores de $\tan \delta$ ($< 0,01$) que resultan "transparentes" a la irradiación de microondas.

Tabla 1.1. Valores de $\tan \delta$ para algunos solventes.

Abs.	Solvente	$\tan \delta$
ALTA	Etilenglicol	1,350
	Etanol	0,941
	DMSO	0,825
	Metanol	0,659
	Nitrobenceno	0,589
MEDIA	2-butanol	0,447
	DCB	0,280
	Ac. acético	0,174
	DMF	0,161
	Agua	0,123
BAJA	Cloroformo	0,091
	Acetonitrilo	0,062
	THF	0,047
	Diclorometano	0,042
	Hexano	0,020

1.1.2.c. Calentamiento por microondas y calentamiento convencional

El hecho de que la irradiación por microondas revolucionara la química sintética es indiscutible. Lo que aún queda por conocer es en qué se diferencian el calor generado por métodos convencionales de aquel que proviene de los procesos dieléctricos.

Cuando se calienta una sustancia mediante un baño de aceite o manto de calentamiento, la energía térmica es transmitida por corrientes convectivas y depende de la conductividad térmica de toda la muestra, siendo por lo general un proceso lento. Este fenómeno está caracterizado por altas temperaturas en las paredes del recipiente, las cuales son superiores a las del seno de reacción (Figura 1.5.a).

De manera opuesta, la irradiación con MO produce un eficiente calentamiento interno (calentamiento volumétrico desde el seno de la reacción) debido al acoplamiento directo de las MO con las moléculas. Por lo general, las paredes del recipiente se mantienen a menores temperaturas que la mezcla, generando gradientes inversos a los de calentamiento convencional (Figura 1.5.b).²⁰

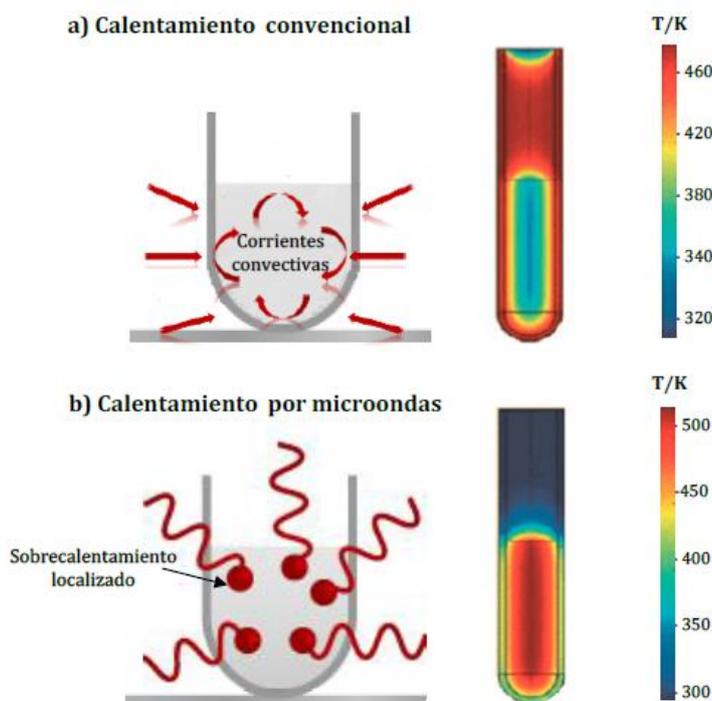
El fenómeno por el cual la irradiación de MO reduce los tiempos de reacción ha sido muy discutido en los últimos años y ha dado lugar a diversas teorías. Algunos autores sugieren la posibilidad de **efectos de microondas no térmicos**, los cuales resultarían de la interacción del campo electromagnético con moléculas específicas, intermediarios e incluso estados de transición en el medio de reacción, lo cual no estaría asociado a un cambio macroscópico en la temperatura de reacción. Por ejemplo, se ha propuesto que para cierto tipo de reacciones, la presencia de un campo eléctrico afecta la orientación de moléculas dipolares o intermediarios de reacción, produciendo modificaciones en el valor del factor pre-exponencial (A) o la energía de activación (término entrópico) en la ecuación de Arrhenius (Ec. 1.2.).^{20,21}

$$k = A e^{-(E_a/RT)} \quad \text{Ec. 1.2.}$$

Efectos similares se dan en reacciones que transcurren a través de un estado de transición polar cuya energía de activación se ve disminuida por estabilización en el campo de las MO.^{22,23}

Figura 1.5.

Comparación de calentamiento convencional **(a)** y por microondas **(b)**.
Figura adaptada de ref. 20.



Por otro lado, se han informado muchas reacciones en donde los resultados ponen de manifiesto la existencia de **efectos específicos de las microondas**, los cuales se deberían únicamente a los efectos del calentamiento dieléctrico, entre los que se incluyen: el sobrecalentamiento de solventes a presión atmosférica; el calentamiento selectivo de, por ejemplo, catalizadores o reactivos con gran capacidad de absorción de MO en un medio menos polar o sin solvente; la formación de puntos microscópicos de sobrecalentamiento (conocidos como *hotspots*) y la eliminación del efecto de las paredes causada por la inversión del gradiente de temperatura.^{24,25}

Luego de más de una década de investigación en esta área se concluyó que los efectos no térmicos de MO no existen y que los efectos específicos pueden ser demostrados muy pocas veces en determinadas reacciones.

Hoy en día se sabe que los efectos observados en reacciones asistidas por MO son el resultado de un **fenómeno puramente térmico/cinético**, el cual depende exclusivamente de la capacidad de la mezcla de reacción para absorber eficientemente la energía de MO a través del mecanismo de calentamiento dieléctrico. Por lo tanto, este efecto considera que la reducción del tiempo de reacción es causada por el rápido aumento de temperatura que se produce en las condiciones en las cuales se llevan a cabo las reacciones (comúnmente reactores cerrados y pequeños, alta

potencia de irradiación, solventes con alta absorción de MO). Los perfiles de temperatura que se logran de esta manera difícilmente puedan ser reproducidos por técnicas convencionales y es este hecho el que explicaría las diferencias encontradas. Cabe destacar además que, al obtener diferentes perfiles de calentamiento, cuando se trabaja con reacciones que poseen distribuciones de productos dependientes de perfiles cinéticos complejos, se encuentra selectividad hacia alguno de ellos y las reacciones resultan con menor cantidad de subproductos.²⁶

1.1.2.d. Equipamiento y métodos disponibles

En la actualidad existen dos tipos de instrumentos diseñados específicamente para reacciones por MO. Uno de ellos es el equipo **multimodo** que se encuentra conceptualmente relacionado a los microondas domésticos. En éstos, las MO ingresan a una cavidad reflejándose en las paredes y siendo absorbida por el/los reactores dentro de la cavidad (Figura 1.6.a). Los reactores se ubican en rotores que aseguran la absorción de las MO de la manera más homogénea posible. Las cavidades pueden construirse de gran tamaño y permiten trabajar a escala preparativa. El segundo tipo se conoce como microondas **monomodo** y en éstos, las ondas electromagnéticas son conducidas desde la fuente hacia la cavidad generando una onda estacionaria incidente en la reacción (Figura 1.6.b). El resultado final es un calentamiento eficiente y direccionado hacia el centro del reactor. Las cavidades de los monomodos son de menor tamaño y son aptas para reacciones a baja escala.^{12,13}

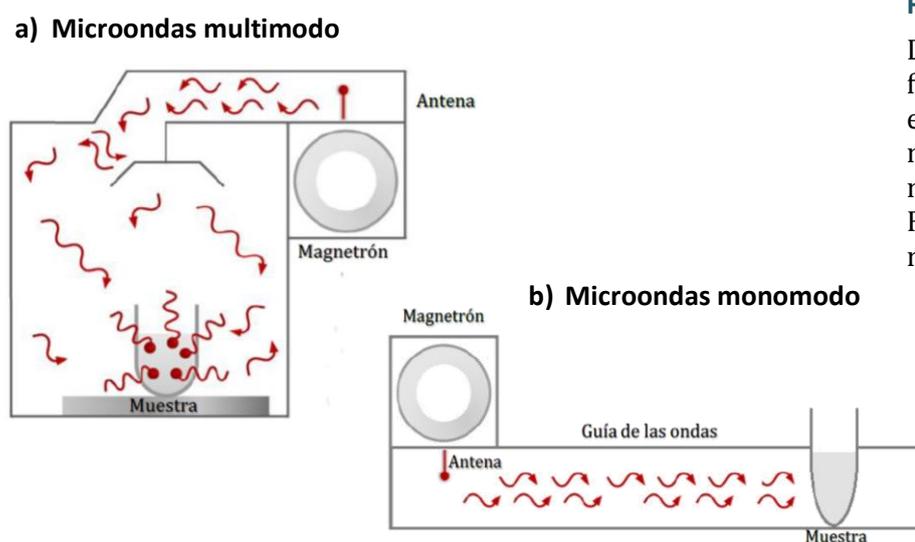


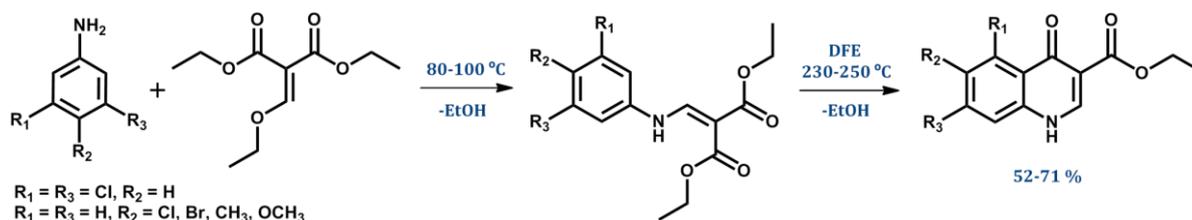
Figura 1.6.

Diagrama de funcionamiento de un equipo de MO multimodo **(a)** y uno monomodo **(b)**. Figura adaptada de ref. 13.

En cuanto a la metodología de trabajo con equipos de MO, éstos ofrecen varias posibilidades. Una de ellas es el empleo de **sistema cerrado**, utilizando como reactor un tubo de vidrio o cuarzo (10 mL) especialmente adaptado para controlar la presión interna mediante un *septum* de goma que forma parte del tapón del reactor. La otra alternativa es el **sistema abierto**, utilizando un balón (25-50 mL) con sistema de reflujo simulando las condiciones de la síntesis convencional. A su vez, los equipos permiten al usuario la programación de métodos que controlan la presión, la temperatura y la potencia aplicada. Dentro de los métodos más utilizados en síntesis orgánica podemos mencionar: **métodos dinámicos**, donde la potencia aplicada por el equipo de MO varía en función de la temperatura indicada; **métodos de potencia fija**, donde el usuario indica el valor máximo de potencia y un rango de temperaturas, con lo cual el equipo de MO irradia a ese valor de potencia si se necesita aumentar la temperatura de la muestra o no irradia si la temperatura superó el valor indicado y **métodos combinados**, los cuales permiten realizar varias etapas consecutivas variando tiempo, temperatura y potencia en cada paso.

1.1.3. Antecedentes de la síntesis de quinolonas

La síntesis convencional de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas a partir de anilinas sustituidas y etoximetilmalonato de dietilo (EMME) fue desarrollada en nuestro grupo de trabajo por López Rivilli.^{27,28} La primera etapa de la síntesis consiste en una reacción de sustitución nucleofílica sobre el carbono vinílico del EMME. Posteriormente, el producto de sustitución sufre una reacción de ciclocondensación intramolecular a altas temperaturas para dar el anillo de 3-carboetoxi-quinolin-4-ona (Esquema 1.1). Estas dos reacciones consecutivas son conocidas como reacción de Gould-Jacobs,²⁹ a la cual se hará mención en el Capítulo 2.



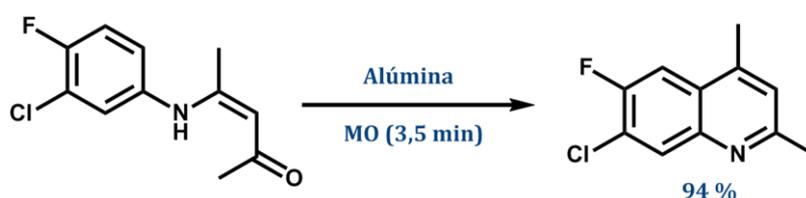
Esquema 1.1. Síntesis convencional de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas a partir de anilinas y EMME.

La síntesis se realizó empleando un equipo de reflujo acoplado a un destilador, el cual permitió la remoción del etanol producido en la reacción. Las condiciones óptimas para la primera etapa fueron 1 h a 80-100 °C, sin solvente; mientras que la segunda etapa se realizó en un rango de 45 min a 5 h a 230-250 °C dependiendo del sustituyente, utilizando difenil éter (DFE) como solvente.

Con el advenimiento del uso de las MO como herramienta sintética, varios grupos de investigación han comenzado a utilizarla no solo para lograr mejores rendimientos en menor tiempo, sino también para desarrollar metodologías sintéticas más amigables con el medio ambiente evitando el uso de solventes y/o reactivos tóxicos.

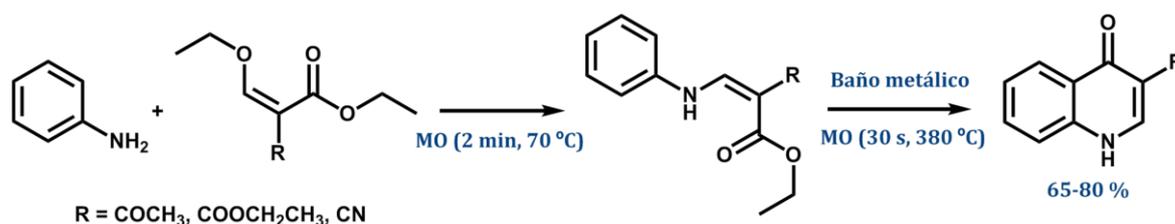
A continuación se resumen algunas de las técnicas aplicadas para la síntesis alternativa de núcleos de quinolonas.

Kidwai y colaboradores desarrollaron la síntesis de 7-cloro-6-fluoro-2,4-dimetilquinolina con una tecnología limpia, simple y económica mediante la adsorción del reactivo en alúmina acida y posteriormente irradiando con MO utilizando un baño de alúmina (Esquema 1.2).³⁰



Esquema 1.2. Síntesis de 7-cloro-6-fluoro-2,4-dimetilquinolina.

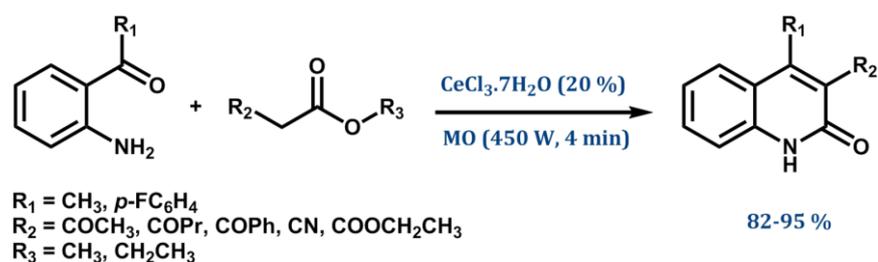
La síntesis de quinolin-4-onas en ausencia de solvente fue desarrollada por Černuchová, obteniendo buenos rendimientos y en menor tiempo comparado con la síntesis clásica en DFE (Esquema 1.3).³¹



Esquema 1.3. Síntesis de quinolin-4-onas sin solvente.

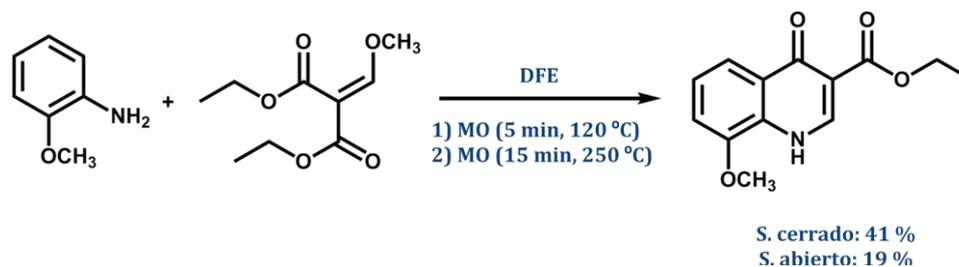
Jia y colaboradores reportaron un método rápido y eficiente para la síntesis de quinolin-2-onas sustituidas utilizando cantidades catalíticas de tricloruro de cerio

heptahidratado en reacciones en MO sin solvente (Esquema 1.4).³²



Esquema 1.4. Síntesis de quinolin-2-onas utilizando catalizador de Ce.

El compuesto 3-carboetoxi-8-metoxi-quinolin-4-ona fue sintetizado por Albrecht y colaboradores a partir de 2-metoxi-anilina y metoximetilenmalonato de dietilo mediante una metodología *one-pot* (o en un solo paso) utilizando DFE como solvente. Los autores evaluaron tanto el sistema abierto como cerrado, obteniendo 19 % y 41 % de rendimiento respectivamente (Esquema 1.5).³³



Esquema 1.5. Síntesis de quinolin-4-onas en DFE.

Considerando que la síntesis convencional fue optimizada previamente en el grupo de trabajo, esta tesis se focalizó en la búsqueda de metodologías alternativas que sean más simples, rápidas y amigables con el medio ambiente. Los antecedentes antes mencionados sugerían que las 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (**Q**) podrían ser sintetizadas mediante irradiación con MO. Por lo tanto, los objetivos específicos planteados en este capítulo fueron los que se describen en la próxima sección.

1.2.

Objetivos específicos

- Sintetizar derivados de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas ya sea mediante síntesis convencional o asistida por MO.
- Optimizar las condiciones para la síntesis asistida por MO de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas explorando al máximo las posibilidades que ofrece esta metodología.

- Comparar ambas metodologías utilizadas en la síntesis de los mencionados núcleos de quinolonas.
- Sintetizar 3-carboxi-quinolin-4-onas mediante la hidrólisis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas utilizando irradiación de MO.
- Sintetizar 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas a partir de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas aplicando irradiación de MO.

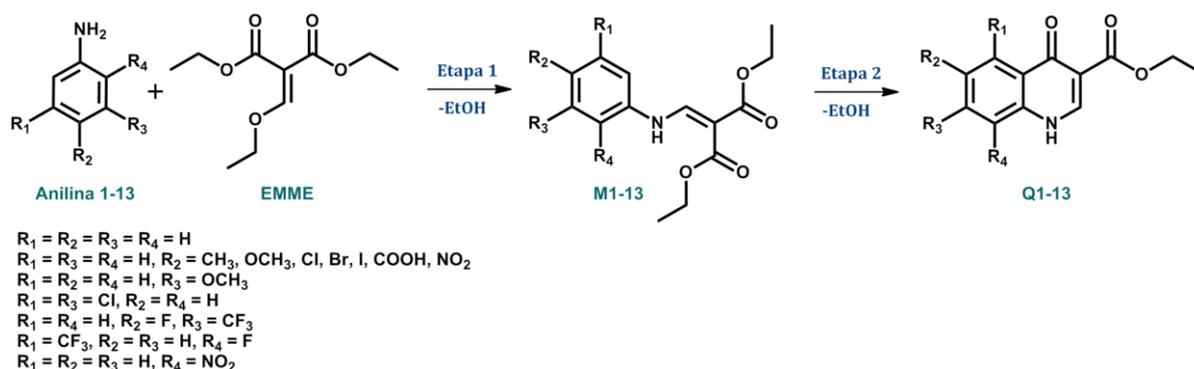
1.3.1. Optimización de la síntesis asistida por microondas

Los primeros ensayos se realizaron utilizando la 4-metil-anilina como modelo para desarrollar la reacción de formación de quinolonas mostrada en el Esquema 1.6.

Para llevar a cabo la reacción, una mezcla equimolar de anilina y EMME se irradió durante 1 min a 80 °C en sistema cerrado y sin solvente (Etapa 1, Esquema 1.6). Por espectroscopía de RMN ¹H del crudo de reacción se determinó que la formación de 4-metil-fenilamino-metilenmalonato de dietilo (**M2**) fue cuantitativa (> 95 %), y que el mismo se obtuvo con un grado de pureza apto para ser utilizado en la siguiente etapa de reacción sin purificación previa. Se prosiguió entonces con la optimización de la Etapa 2; para ello, **M2** fue irradiado a la máxima potencia del equipo empleado (300 W) durante varios minutos en sistema cerrado y sin solvente, ya que es la condición experimental más segura, simple y amigable con el medio ambiente. Sin embargo, la temperatura alcanzada fue solo 115 °C, un valor muy bajo considerando que la temperatura para dar lugar a la ciclización de malonatos en síntesis convencional y asistida por MO debe ser al menos 220 °C.^{28,34}

1.3.

Síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas



Esquema 1.6. Síntesis asistida por MO de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (Q1-13).

Una de las estrategias más comúnmente utilizadas para aumentar la absorción de MO y favorecer la transferencia de calor en reacciones que involucran reactivos y/o solventes con baja absorción es el uso de elementos de calentamiento pasivo o sensibilizadores.³⁵ Es por ello que se probaron reacciones utilizando grafito (partículas < 20 µm, ≥ 99,9 % pureza) y CSi (200-450 mesh) como susceptores para inducir el calentamiento. Bajo estas condiciones, la temperatura de la mezcla de reacción alcanzó valores de 220-260 °C dependiendo del tiempo de irradiación y la cantidad de material absorbente. Sin embargo, los rendimientos continuaban siendo bajos tanto en sistema abierto como cerrado (7-26 %, entradas 1-5 de la Tabla 1.2). Además, estos sólidos carbonosos resultaron un inconveniente adicional a la hora de removerlos de la mezcla de reacción debido a la insolubilidad de las quinolonas en la mayoría de los solventes orgánicos frecuentemente utilizados.

Con el objetivo de mejorar no solo la absorción de microondas sino también de favorecer el proceso de ciclización de **M2** a la 6-metil-3-carboetoxi-quinolin-4-ona (**Q2**), se probaron diferentes catalizadores como: Ce(NO₃)₃, BiVO₄, bentonita, ácido polifosfórico y Na₂CO₃; los cuales fueron seleccionados en base a antecedentes bibliográficos. Los catalizadores de cerio y bismuto han sido utilizados como ácidos de Lewis para favorecer la regio- y quimio-selectividad en varios procesos químicos,³² el ácido polifosfórico ha sido utilizado para la formación de varias quinolin-4-onas³³ y algunos catalizadores básicos también han sido evaluados en la síntesis de 2-aril-quinolin-4-onas.³⁶ Además, diferentes arcillas han sido utilizadas en síntesis de heterociclos asistidas por MO, particularmente en reacciones sin solvente.^{37,38}

El uso de los catalizadores mencionados permitió alcanzar la temperatura de reacción adecuada utilizando sistema cerrado, pero los rendimientos de **Q2** obtenidos fueron muy bajos (< 15 %) además de observarse una significativa descomposición del material de partida.

Debido al fracaso de las reacciones heterogéneas, se decidió evaluar el uso de diferentes solventes como: agua, acetonitrilo, *N,N*-dimetilformamida (DMF), 1,2-diclorobenceno (DCB) y DFE. En las reacciones con agua y acetonitrilo, las temperaturas no superaron los 200 °C por lo que la conversión a quinolona fue nula; con DMF se alcanzó una temperatura de 250 °C en 1 min a 300 W, dando

solo un 10 % de producto; mientras que al utilizar DCB y DFE los rendimientos mejoraron apreciablemente (20-49 %, entradas 6-12 Tabla 1.2).

Al evaluar los tiempos de irradiación se determinó que a tiempos largos de reacción (> 10 min) se favorece la descomposición de los reactivos y se obtienen bajos rendimientos, como fue observado previamente por Černuchová.³¹

Aplicando métodos de potencia fija se determinó que la misma debe ser por lo menos 200 W para obtener resultados aceptables (entradas 7-9, Tabla 1.2). Esta condición puede lograrse también aplicando un método dinámico (o de potencia variable) a una temperatura tal que permita arribar a valores entre 200-300 W (entradas 6 y 10, Tabla 1.2). Hasta este punto, el mejor resultado obtenido en sistema cerrado fue utilizando DCB como solvente y aplicando un método dinámico de potencia a 250 °C durante 1 min (entrada 10, Tabla 1.2). Posteriormente, se comprobó que añadiendo el solvente desde el principio y empleando métodos de irradiación combinados, es decir, 1 min a 80 °C para generar **M2** seguido de 2-10 min a 250 °C, los rendimientos de **Q2** eran equivalentes a aquellos obtenidos mediante dos pasos de reacción individuales. Esto permitió sintetizar las quinolonas mediante una metodología en un solo paso o *one-pot*, la cual fue utilizada en las reacciones ulteriores.

Como se observa en la Tabla 1.2 los rendimientos obtenidos en sistema cerrado no fueron buenos ni comparables a los obtenidos por síntesis convencional.

Teniendo en cuenta que se genera un mol de etanol en cada etapa de la reacción, el cual puede ser removido fácilmente a presión atmosférica, se decidió evaluar la reacción en sistema abierto. El arreglo experimental fue diseñado de manera de simular las condiciones de la síntesis convencional (ver sección experimental 1.5 de este capítulo) y en algunos casos, re-adaptando el sistema para favorecer la remoción del etanol, ya sea por condensación con líquidos criogénicos o por arrastre con flujo de aire, y de esta manera desplazar el equilibrio hacia productos.

Si bien el uso de DCB como solvente fue adecuado para la síntesis en sistema cerrado (entradas 10-12, Tabla 1.2), en sistema abierto no se produjo la ciclización de **M2** a **Q2**, ya que la temperatura de la mezcla de reacción no superó 180 °C (entrada 13, Tabla 1.2). Los resultados mejoraron

Tabla 1.2. Condiciones evaluadas en la síntesis de 6-metil-3-carboetoxi-quinolin-4-onas (Etapa 2).

Entrada	Solvente	Aditivo (% P/P)	Tipo de Sistema	Potencia (W) ^a	Tiempo (min)	Temp. (°C) ^b	Rec. de masa (%) ^c
1	---	CSi (7 %)	Cerrado	100-200	10	200 (223)	7
2	---	CSi (7 %)	Cerrado	25-175	2	260 (268)	26
3	---	CSi (5 %)	Abierto	100-300	5	250 (258)	23
4	---	Grafito (8 %)	Cerrado	50-250	2	250 (253)	---
5	---	Grafito (8 %)	Abierto	175-300	2	250 (255)	9
6	DFE	---	Cerrado	150-300	1	250 (252)	20
7	DFE	---	Cerrado	100	5	260 ± 10	23
8	DFE	---	Cerrado	200	5	260 ± 10	34
9	DFE	---	Cerrado	300	5	260 ± 10	32
10	DCB	---	Cerrado	100-250	1	250 (255)	49
11	DCB	---	Cerrado	200	5	260 ± 10	33
12	DCB	---	Cerrado	200	10	260 ± 10	30
13	DCB	---	Abierto	150-300	3	250 (180)	---
14	DFE	---	Abierto	50-300	5	250 (253)	57
15	DFE	---	Abierto	275-300	2	250 (252)	41
16	DFE	---	Abierto	200-300	2	250 (251)	67 ^d
17	DFE	---	Abierto	150-300	1	260 (261)	55 ^d
18	DFE	---	Abierto	200	4	260 ± 10	57 ^e

a- Método dinámico se informa el rango de potencia al cual irradió el equipo; método a potencia fija se indica el valor estipulado. **b-** Entre paréntesis se indica la máxima temperatura alcanzada. **c-** Porcentaje de producto calculado a partir de los moles de metil-anilina. **d-** Equipo adaptado con balón sumergido en N₂ líquido. **e-** Equipo adaptado con flujo de aire.

notablemente con DFE como solvente, especialmente utilizando condensación de etanol para desplazar el equilibrio (entradas 16 y 17, Tabla 1.2). Empleando corriente de aire se obtuvieron resultados similares (entrada 18, Tabla 1.2), aunque el diseño experimental es más engorroso, por lo que se optó por la metodología previamente mencionada (entrada 16).

En cuanto al tiempo de reacción se determinó que un período de irradiación mayor a 4 min no mejora los rendimientos, sino que, como se dijo anteriormente, aumentan los productos de degradación.

Resumiendo, las mejores condiciones encontradas para la síntesis de **Q2** fueron 2 min de irradiación de MO en sistema abierto, utilizando DFE como solvente y aplicando un método de potencia dinámico a 250 °C (entrada 16, Tabla 1.2).

Teniendo en cuenta estas condiciones se prosiguió a evaluar el efecto de la temperatura no solo con el sustituyente metilo, sino también con otros sustituyentes en posición 4 de la anilina de partida, como se muestra en la Tabla 1.3. En algunos casos, el mayor porcentaje de quinolona se obtuvo a 250 °C; sin embargo, los productos estaban muy impuros. Por lo tanto, la temperatura óptima para esta reacción fue 240 °C, ya que permitió obtener buenos rendimientos y un grado elevado de pureza del producto.

Tabla 1.3. Efecto de la temperatura en la síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas. Comparación sistema de irradiación abierto vs. cerrado.

Entrada	R ₂	Rendimiento (%) ^a				
		Sistema abierto ^b				Sistema cerrado ^c
		220 °C	230 °C	240 °C	250 °C	260 ± 10 °C
1	H	25	58	75	62	32
2	CH ₃	10	34	66	67	49 ^d
3	OCH ₃	13	48	54	55	30
4	Cl	4	36	80	82	44
5	Br	12	70	65	46	57
6	I	19	23	67	85	59

a- Rendimiento de producto aislado; relación anilina: EMME (1:1). **b-** DFE, método dinámico de potencia, 3 min⁵. **c-** DCB, 200 W, 6 min⁵. **d-** 250-255 °C, 2 min⁵. (⁵ Tiempo total: Etapa 1 + Etapa 2)

En la Tabla 1.3 también se muestran los resultados obtenidos en sistema cerrado para la síntesis de quinolonas sustituidas en posición 6 del anillo. Sólo para el sustituyente metilo se aplicó la mejor condición encontrada previamente mostrada en la Tabla 1.2 (entrada 10). Sin embargo, para los demás sustituyentes la condición más adecuada fue sistema a potencia fija (200 W) durante 5 min.

Comparando los resultados en sistema abierto y cerrado se deduce que la síntesis de quinolonas está favorecida en sistema abierto. Este hecho, también observado en otras reacciones,³⁹ demuestra que el etanol producido durante la reacción debe ser removido para promover el desplazamiento del equilibrio hacia productos.

Los rendimientos mostrados en la Tabla 1.3 mejoraron aún más cuando se utilizó un exceso de EMME, como había sido demostrado previamente por Lange en la síntesis asistida por MO de 3-aril-4-hidroxiquinolin-2-onas.⁴⁰

Finalmente, las condiciones óptimas para la síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas fueron: **1 min de irradiación**

de MO a 80 °C seguido de 2 min a 240 °C, utilizando sistema abierto, aplicando un método dinámico de potencia, DFE como solvente y una proporción anilina :EMME igual a 1:2.⁴¹ Los resultados obtenidos utilizando dichas condiciones se muestran en la Tabla 1.5 de la Sección 1.3.3.

1.3.2. Comparación de metodologías: Microondas vs. Convencional

Utilizando los compuestos sintetizados hasta el momento mediante irradiación con MO, se realizó un estudio comparativo con la metodología de calentamiento convencional, analizando los alcances y limitaciones de ambas técnicas.

En la Tabla 1.4 se muestran los tiempos de reacción requeridos para la Etapa 2 y los rendimientos alcanzados en la síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas sustituidas en posición 6 cuando se utilizó irradiación de MO o calentamiento convencional.

Tabla 1.4. Comparación de metodologías en la síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas.

R ₂	Microondas		Convencional	
	Tiempo (min) ^a	Rend. (%) ^b	Tiempo (min) ^a	Rend. (%) ^b
H	2	68	60	31
CH ₃	2	74	60	77
OCH ₃	2	65	45	58
Cl	2	82	180	71
Br	2	83	300	71
I	2	87	180	63
COOH	2	71	60	63

a- Tiempo de la Etapa 2. b- Producto recristalizado de DMF.

Los rendimientos obtenidos por irradiación con MO fueron levemente superiores a aquellos logrados con la síntesis convencional, pero la ventaja adicional de esta metodología es la reducción de los tiempos de reacción de horas a minutos. Sin embargo, al momento de optimizar las condiciones de reacción, la síntesis asistida por MO presenta más variables para controlar y algunas veces la

irreproducibilidad de las reacciones es mayor respecto a lo observado en la síntesis de calentamiento convencional.

1.3.3. Síntesis convencional y asistida por microondas de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas

Teniendo optimizadas ambas metodologías sintéticas (convencional y MO) y, habiendo comprobado la similitud en cuanto a los rendimientos logrados con cada protocolo; se procedió a ampliar la quimioteca de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas utilizando una u otra metodología dependiendo de la disponibilidad del equipo de MO, entre otros factores.

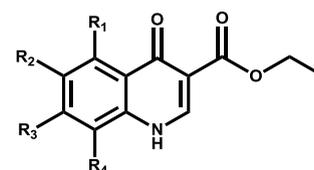


Tabla 1.5. Quimioteca de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas.

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Metodología	Tiempo (min) ^a	Rend. (%) ^b
Q1	H	H	H	H	Microondas	1 + 2	75 (68)
Q2	H	CH₃	H	H	Microondas	1 + 2	79 (74)
Q3	H	OCH₃	H	H	Microondas	1 + 2	68 (65)
Q4	H	H	OCH₃	H	Convencional	30 + 60	41 (32)
Q5	H	Cl	H	H	Microondas	1 + 2	87 (82)
Q6	Cl	H	Cl	H	Convencional	30 + 120	85 (79)
Q7	H	Br	H	H	Microondas	1 + 2	91 (83)
Q8	H	I	H	H	Microondas	1 + 2	89 (87)
Q9	H	F	CF₃	H	Convencional	30 + 60	73
Q10	CF₃	H	H	F	Convencional	30 + 60	2
Q11	H	COOH	H	H	Microondas	60 + 60	80 (71)
Q12	H	NO₂	H	H	Convencional	120 + 120	64 (56)
Q13	H	H	H	NO₂	Convencional	120 + 60	22 (15)

a- Tiempo Etapa 1 + tiempo Etapa 2. **b-** Rendimiento de producto aislado; calculado a partir de los moles de anilina. Entre paréntesis se indica el rendimiento luego del proceso de purificación. Relación anilina: EMME (1:2).

La Tabla 1.5 resume las condiciones experimentales que condujeron a los mejores rendimientos para cada quinolona (**Q**). Allí puede observarse que los sustituyentes tomadores de electrones como el grupo nitro desactivan la anilina para su ataque nucleofílico (Etapa 1), ya que los tiempos de reacción requeridos en esta etapa son mayores que para el caso de sustituyentes donores como el grupo metoxi.

En general, los rendimientos fueron de buenos a muy buenos, excepto para la formación de **Q10**, el cual se obtuvo

con un rendimiento muy bajo (2 %). Además, no pudieron ser sintetizadas quinolonas conteniendo un sustituyente carboxilo en posición 7 ni con dos sustituyentes nitro en posiciones 6 y 8, debido a la descomposición de los reactivos durante la reacción.

1.4.

Derivatización de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas

Diferentes 3-carboetoxi-quinolin-4-onas se utilizaron como precursores de ácidos carboxílicos y amidas conteniendo el núcleo quinolona. La síntesis de estos nuevos compuestos surgió a partir de un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. David N'Da del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Potchefstroom, Sudáfrica,[†] quienes se especializan en el descubrimiento de nuevas drogas antimaláricas.

La malaria o paludismo es una de las enfermedades más extendidas en el mundo, particularmente en países subdesarrollados y especialmente en la región Sub-Sahara de África. Actualmente 300 a 500 millones de personas en el mundo sufren de malaria y alrededor de dos millones de personas mueren por causa de la misma.

Esta enfermedad es generada por parásitos del género *Plasmodium*, ya sean *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* y *P. ovale*, siendo aquellos del tipo *Plasmodium falciparum* los causantes de la infección mortal. Los vectores de esta enfermedad son diversas especies del mosquito hembra del género *Anopheles*.⁴²

Las drogas antimaláricas utilizadas ampliamente hasta hace poco tiempo, han sido la quinina y la cloroquina (Figura 1.7). Sin embargo, el avance de la enfermedad y la utilización abusiva de dichas sustancias como profilaxis han conducido al desarrollo de resistencia del parásito (*P. falciparum*) hacia tales moléculas.⁴³ Es por tal motivo que grupos de todo el mundo se especializan en la búsqueda de nuevas drogas antimaláricas.

En el grupo del Dr. David N'Da se realizó un ensayo preliminar de actividad antimalárica *in vitro* de quinolonas contra una cepa de *Plasmodium falciparum* sensible a cloroquina. Dichos estudios arrojaron resultados alentadores al descubrir que la quinolona **Q3** ($R_2 = OCH_3$) presentó un

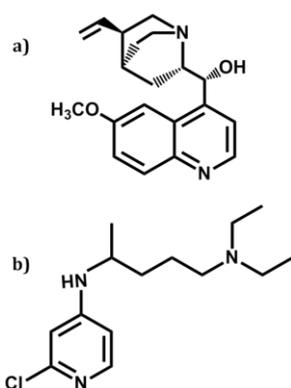


Figura 1.7.

Estructura de potentes antimaláricas: (a) quinina y (b) cloroquina.

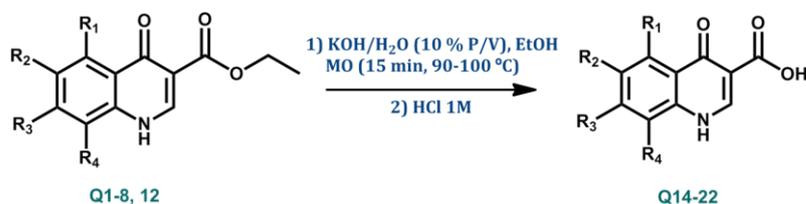
[†] Dicha colaboración forma parte del proyecto: Flag-ship Grant (SA-ARG-SW) - "Development to the Clinical Phase of Oxidant and Redox Drug Combinations for Treatment of Malaria, TB and Related Diseases".

valor de concentración inhibitoria media (IC_{50}) igual a $0,913 \mu\text{M}$, por lo que dicho compuesto fue considerado como activo al ser comparado con cloroquina ($IC_{50} = 0,016 \mu\text{M}$). Sin embargo, la insolubilidad de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas en el medio utilizado para los ensayos biológicos dificultó la evaluación antiplasmódica de dichos núcleos. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes y los reportados por Zhang,⁴⁴ se planteó la derivatización de las 3-carboetoxi-quinolin-4-onas a sus correspondientes 3-carboxi-quinolin-4-onas y 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas para mejorar no solo su solubilidad sino también su actividad.

1.4.1. Síntesis de 3-carboxi-quinolin-4-onas

La formación de ácidos carboxílicos a partir de carboetoxi-quinolonas suele realizarse tanto en medio ácido como básico y generalmente demanda largos tiempos de reacción (2-24 h) a la temperatura de reflujo del solvente.^{44,45,46} Como se discutió anteriormente, una de las ventajas de la síntesis asistida por MO es la notable reducción de los tiempos de reacción, por lo que ésta metodología fue aplicada para la hidrólisis de las quinolonas sintetizadas previamente.

Las 3-carboetoxi-quinolin-4-onas fueron hidrolizadas empleando una solución acuosa de KOH (10 % P/V), utilizando etanol como solvente e irradiando durante 15 min, en sistema abierto, a la temperatura de reflujo de la mezcla. Luego de finalizada la reacción, se acidificó con HCl concentrado para obtener los correspondientes ácidos (Esquema 1.7, Tabla 1.6).



Esquema 1.7. Síntesis de 3-carboxi-quinolin-4-onas.

La hidrólisis de los ésteres fue exitosa en cuanto a tiempo, simplicidad de la metodología y reactivos/solventes empleados. Además, los derivados ácidos (Q14-22) fueron obtenidos en su mayoría con excelentes rendimientos. Solamente la quinolona Q9 no reaccionó bajo las condiciones

ensayadas y **Q11** dio lugar a otras transformaciones obteniéndose una mezcla de productos indeseados.

Tabla 1.6. Quimioteca de 3-carboxi-quinolin-4-onas sintetizadas.

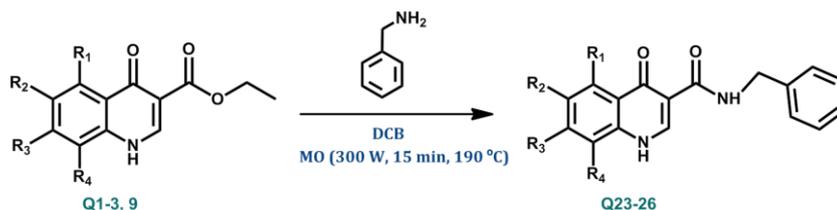
Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rend. (%) ^a
Q14	H	H	H	H	95
Q15	H	CH₃	H	H	97
Q16	H	OCH₃	H	H	81
Q17	H	H	OCH₃	H	92
Q18	H	Cl	H	H	90
Q19	Cl	H	Cl	H	75 ^b
Q20	H	Br	H	H	86
Q21	H	I	H	H	82
Q22	H	NO₂	H	H	32

a- Producto puro, sin recrystalizar. **b-** Recrystalizado de DMF.

1.4.2. Síntesis de 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas

La obtención de carboxamida-quinolin-4-onas ha sido realizada utilizando como precursor tanto el derivado carboxi-quinolin-4-ona,⁴⁷ como el derivado carboetoxi-quinolin-4-ona.⁴⁸ Ambas vías sintéticas implican largos tiempos de reacción (10-20 h) y el uso de bases no convencionales como HBTU, HOBT y DIPEA. Teniendo en cuenta las ventajas de la irradiación con MO, se decidió aplicar esta técnica para la síntesis alternativa de estos compuestos.

Se sintetizaron algunos derivados 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas a partir de las 3-carboetoxi-quinolin-4-onas como se muestra en el Esquema 1.8.



Esquema 1.8. Síntesis de 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas.

La reacción se realizó en sistema abierto aplicando un método de potencia fija a 300 W, durante 15 min a reflujo de DCB, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 1.7.

Los rendimientos de la síntesis fueron excelentes, aunque éstos disminuyeron apreciablemente al realizarse la purificación de los compuestos por recristalización debido a la solubilidad de los derivados amidados en muchos de los solventes comúnmente usados en esta técnica.

Tabla 1.7. Quimioteca de 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas.

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rend. (%) ^a
Q23	H	H	H	H	75 (43)
Q24	H	CH₃	H	H	99 (89)
Q25	H	OCH₃	H	H	95 (62)
Q26	H	F	CF₃	H	44 (11)

a- Rendimiento de producto aislado. Entre paréntesis se indica el rendimiento luego del proceso de purificación.

Además, se evaluó la síntesis descrita previamente cambiando la naturaleza de la amina, reemplazando la bencilamina por morfolina. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados deseados luego de irradiar con MO por un tiempo total de 2 h, ni calentando de manera convencional por 6 h, lo cual puede deberse a la baja nucleofilicidad de la amina secundaria en comparación con la primaria.

Finalmente, cabe destacar que las 3-carboetoxi-quinolonas sintetizadas junto con sus derivados 3-carboxi y 3-carboxamidas fueron enviados al grupo del Dr. David N'Da en Sudáfrica para la medición de la actividad antiplasmódica *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum*, la cual se está evaluando al momento de la presentación de esta tesis.

Todos los reactivos empleados fueron de grado comercial y se utilizaron sin previa purificación. Los solventes fueron destilados previamente a su uso. Las cromatografías en capa delgada (TLC, por sus siglas en inglés) se realizaron con sílica-gel Merck (60 DGF254).

Los espectros de RMN ¹H y ¹³C de algunas 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (**Q1-3, 5, 7-8**) fueron realizados en un equipo INOVA Varian FT-600 MHz (¹H a 600 MHz y ¹³C a 150.9 MHz) utilizando (CD₃)₂SO como solvente. Mientras que el resto de los compuestos fueron caracterizados en un equipo Bruker Advance II FT-400 MHz (¹H a 400,16 y ¹³C a 100,56 MHz) utilizando CDCl₃ ó (CD₃)₂SO para los

1.5. Sección experimental

fenilaminometilenmalonatos de dietilo (**M1-13**), $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ para las 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (**Q4, 6, 9-13**), D_2O para las 3-carboxi-quinolin-4-onas (**Q14-22**) y $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ para las 3-(*N*-bencil)-carboxamida-quinolin-4-onas (**Q23-26**). Los corrimientos químicos (δ) se encuentran informados en partes por millón (ppm) tomando como referencia la señal residual de los solventes utilizados y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

Los puntos de fusión se determinaron en un fusiómetro Electrotermal 9100 y se informan sin corrección.

La caracterización de los compuestos sintetizados se encuentra en la sección ANEXO (páginas XI-XVIII).

1.5.1. Metodología convencional

1.5.1.a. Síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas

Los compuestos 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (**Q4, 6, 9-10,12-13**) se sintetizaron siguiendo la metodología descrita por López-Rivilli.^{27,28} La misma consistió en colocar 0,25 g de anilina (1,37-2,03 mmol) y cantidad equimolar de EMME (0,28-0,41 mL) en un balón sumergido en un baño de glicerina para el control de la temperatura. Dicho balón estaba acoplado a un equipo de destilación para la recolección del etanol producido durante la reacción.

La formación de fenilaminometilenmalonatos de dietilo (**M4, 6, 9-10, 12-13**) correspondiente a la Etapa 1, se llevó a cabo sin solvente a 80 °C. Al finalizar la reacción, los productos se obtuvieron en condiciones de óptima pureza para ser utilizados en el paso posterior. Para continuar con la reacción hacia la formación de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (Etapa 2) se agregaron ~2 mL de DFE y se aumentó la temperatura del baño de glicerina a 230-250 °C, hasta conversión total de los malonatos a sus correspondientes quinolonas.

El tiempo de reacción se determinó mediante TLC frente a testigos de los reactivos hasta desaparición total de los mismos, siendo tanto para la Etapa 1 como para la Etapa 2, de 30 min-2 h dependiendo del sustituyente (Ver Tabla 1.5).

Finalizada la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente observándose la aparición de un sólido blanquecino. Luego se agregó hexano para favorecer la precipitación, se filtró y se lavó repetidas veces con hexano y finalmente con acetona para eliminar impurezas solubles y restos de solvente.

Finalmente los productos fueron purificados mediante recristalización de DMF.

1.5.2. Síntesis asistida por microondas

1.5.2.a. Síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas

La síntesis asistida por MO de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (**Q1-3**, **5**, **7-8**, **11**) se realizó en un equipo CEM Discovery monomodo, a partir de una mezcla de 0,25 g de anilina (1,14-2,69 mmol) y 1,08-0,46 mL de EMME respetando una proporción molar anilina: EMME (1:2), utilizando 2 mL de DFE como solvente. Las reacciones se llevaron a cabo en sistema abierto empleando el mismo equipo utilizado en la síntesis convencional y conectando un balón sumergido en N₂ líquido en la salida del refrigerante como se observa en la Figura 1.8. El diseño experimental fue elaborado de manera tal que permita generar un gradiente de temperatura entre la mezcla de reacción y el exterior, para favorecer la remoción del etanol producido en la reacción, y de este modo desplazar el equilibrio hacia la formación de productos.

El calentamiento por MO se realizó mediante la ejecución de un método dinámico combinado provisto por el software del equipo, el cual permite realizar métodos consecutivos de calentamiento. En este caso se aplicó: 1 min de irradiación a 80 °C seguido de 2 min a 240 °C.

Finalizada la reacción, se procedió del mismo modo que en la metodología convencional descrita anteriormente.

1.5.2.b. Síntesis de 3-carboxi-quinolin-4-onas

Los compuestos 3-carboxi-quinolin-4-onas (**Q14-22**) fueron sintetizados a partir de 0,25 g (0,73-1,15 mmol) de su respectiva 3-carboetoxi-quinolin-4-ona, en 2 mL de solución acuosa de KOH (10 % P/V) y 2mL de etanol. La mezcla fue irradiada durante 15 min en sistema abierto a la temperatura de reflujo (90-100 °C). Al finalizar la reacción se observó disolución total del producto, el cual comenzó a precipitar al acidificar con HCl 1M debido a la formación del derivado ácido.

Finalmente, los sólidos fueron recolectados por filtración, lavados con agua y secados al vacío. Solo **Q19** debió ser recristalizado de DMF, el resto de los derivados se obtuvieron con un alto grado de pureza.



Figura 1.8. Diseño experimental para la síntesis asistida por MO de quinolonas. **A)** Adaptador de cuarzo. **B)** Equipo de destilación. **C)** Balón sumergido en N₂ líquido conectado en la salida del refrigerante.

1.5.2.c. Síntesis de 3-(N-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas

Las 3-(N-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas (Q23-26) fueron sintetizadas a partir de 0,13 g (0,43-0,60 mmol) de su respectiva 3-carboetoxi-quinolin-4-ona y exceso de bencilamina (1 mL) en 1 mL de DCB. La mezcla fue irradiada durante 15 min en sistema abierto a la temperatura de reflujo del solvente, aplicando un método de potencia fija a 300 W. Al finalizar la reacción se observó disolución total del producto, el cual comenzó a precipitar luego del agregado de hexano. Los sólidos fueron recolectados por filtración y lavados con éter etílico para eliminar restos de bencilamina en exceso.

Finalmente, los productos fueron recrystalizados de acetona, ayudando a la precipitación mediante el agregado de unas gotas de cloroformo.

1.6. Conclusiones

Con el fin de optimizar la síntesis asistida por MO de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas se probaron las siguientes condiciones: reacciones en sistema abierto y cerrado, el uso de catalizadores ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$, BiVO_4 , bentonita, ácido polifosfórico y Na_2CO_3) o aditivos (CSi y grafito) para aumentar la absorción de MO, la evaluación de diferentes solventes (agua, acetonitrilo, DMF, DCB y DFE), el empleo de diversos métodos de potencia (dinámico y potencia fija), además de evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo.

Se determinó que para este tipo de reacciones el procedimiento óptimo es calentar rápidamente a la mayor temperatura tolerable por la reacción e irradiar a esa temperatura por el menor tiempo posible, como ya lo había anticipado Strauss;⁴⁹ por lo que las condiciones óptimas para la síntesis de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas resultaron: 1 min de irradiación de MO a 80 °C seguido de 2 min a 240 °C, utilizando sistema abierto, aplicando un método dinámico de potencia, DFE como solvente y una proporción anilina:EMME igual a 1:2.

Los rendimientos obtenidos por irradiación con MO fueron levemente superiores a aquellos logrados con la síntesis convencional, aunque la ventaja adicional de esta metodología es la reducción de los tiempos de reacción de horas a minutos.

Se sintetizaron trece derivados de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas bajo las condiciones descriptas anteriormente o

aplicando la metodología convencional previamente descrita por López Rivilli,²⁷ obteniéndose rendimientos moderados a excelentes (32-87 %), excepto **Q10** cuyo rendimiento fue 2 %.

A partir de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas y aplicando la irradiación de MO se sintetizaron nueve derivados de 3-carboxi-quinolin-4-onas mediante hidrólisis en medio básico, obteniéndose en general rendimientos excelentes (75-97 %), a excepción de **Q22** cuyo rendimiento fue 32 %. Además, se sintetizaron cuatro derivados de 3-(*N*-bencil) carboxamida-quinolin-4-onas con rendimientos moderados a excelentes (44-99 %), aunque éstos disminuyeron al recristalizar los productos de acetona debido a la solubilidad de los mismos en dicho solvente (11-89 %).

- (1) Heeb, S.; Fletcher, M. P.; Chhabra, S. R.; Diggle, S. P.; Williams, P.; Cámara, M. Quinolones: From Antibiotics to Autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35* (2), 247–274.
- (2) Centers for Disease Control and Prevention - The History of Malaria, an Ancient Disease <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/#chloroquine> (accessed Aug 11, 2015).
- (3) Leshner, G. Y.; Froelich, E. J.; Gruett, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R. P. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *91*, 1063–1065.
- (4) Wentland, M. P. Structure-Activity Relationships of Fluoroquinolones. In *The New Generation of Quinolones*; Marcel Dekker Inc.: New York, USA, 1990.
- (5) Conrad, M.; Limpach, L. Synthesen von Chinolinderivaten Mittelst Acetessigester. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20* (1), 944–948.
- (6) Gould, R. G.; Jacobs, W. A. The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and 5,6-Benzoquinolines. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61* (10), 2890–2895.
- (7) Oliphant, C. M.; Green, G. M. Quinolones: A Comprehensive Review. *Am. Fam. Physician* **2002**, *65* (3), 455–464.
- (8) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, 2000.
- (9) Moseley, J. D.; Kappe, C. O. A Critical Assessment of the Greenness and Energy Efficiency of Microwave-Assisted Organic Synthesis. *Green Chem.* **2011**, *13* (4), 794.
- (10) Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (3), 279–282.
- (11) Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G. Application of Commercial Microwave Ovens to Organic Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (41), 4945–4948.
- (12) Loupy, A. *Microwaves in Organic Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.

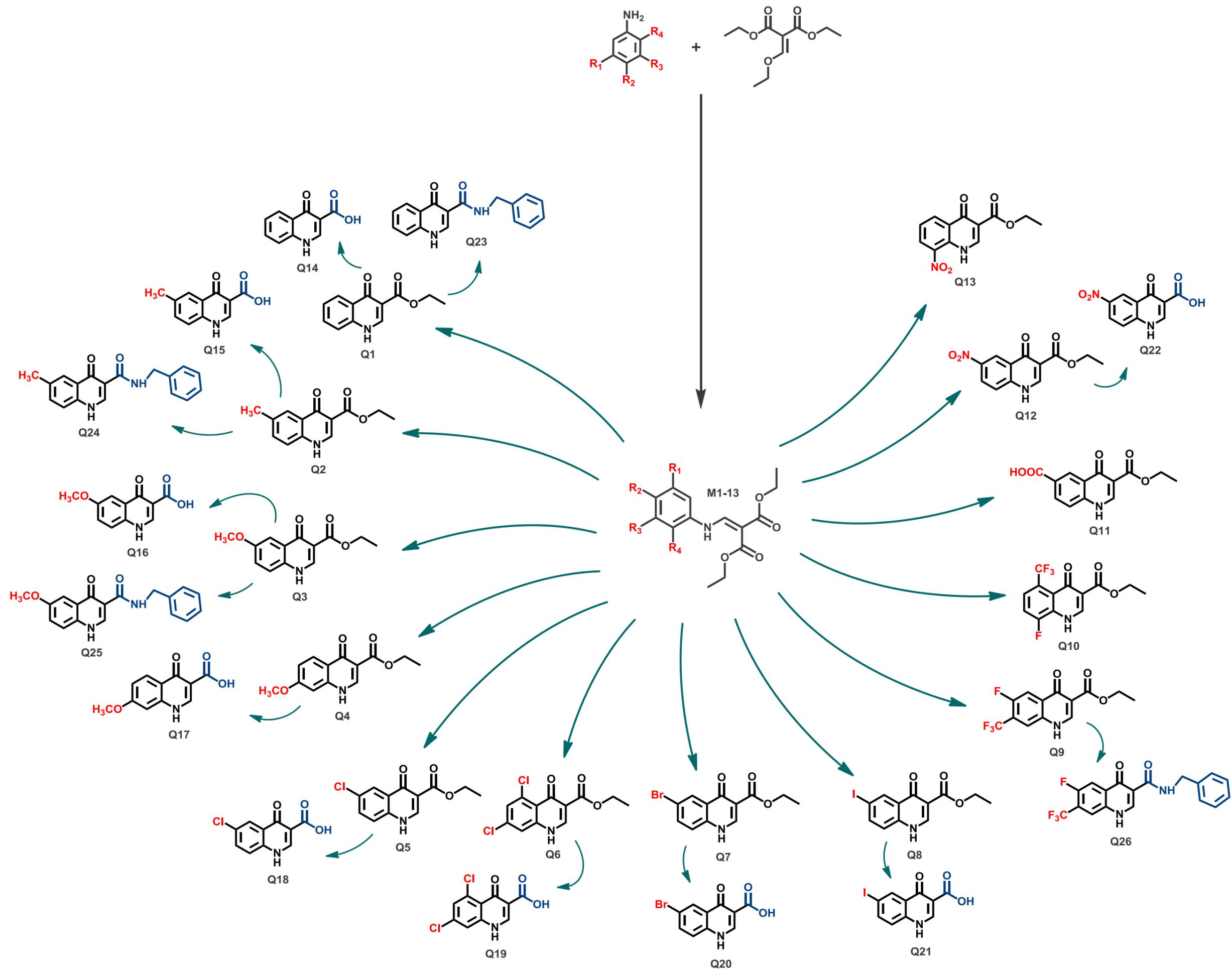
1.7.

Referencias bibliográficas

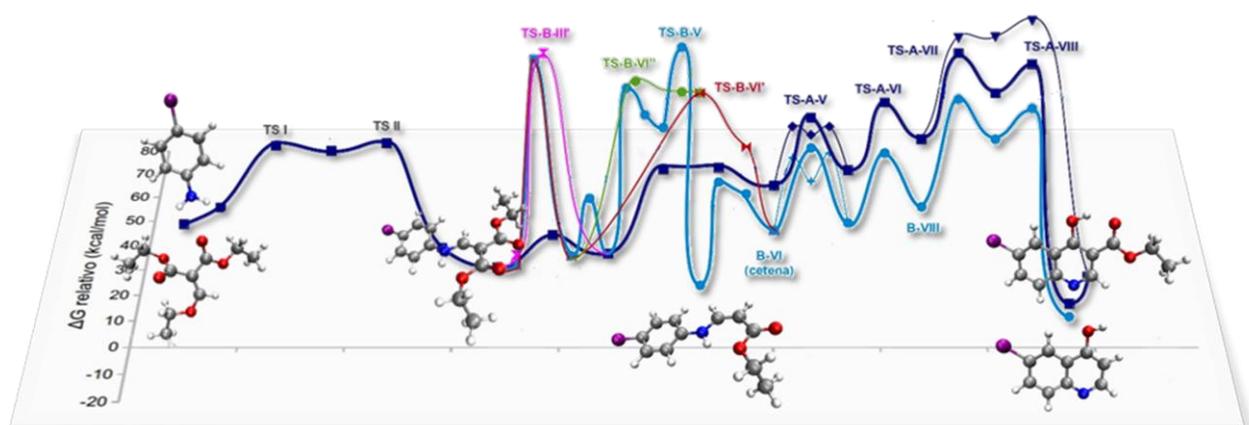
- (13) Kappe, C. O.; Dallinger, D.; Murphree, S. S. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols*; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.
- (14) Mingos, D. M. P.; Baghurst, D. R. Tilden Lecture. Applications of Microwave Dielectric Heating Effects to Synthetic Problems in Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **1991**, *20* (1), 1.
- (15) Gabriel, C.; Gabriel, S.; Grant, E. H.; Grant, E. H.; Halstead, B. S. J.; Mingos, D. M. P. Dielectric Parameters Relevant to Microwave Dielectric Heating. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27* (3), 213–224.
- (16) Strass, D. V.; Woodward, J. R.; Timme, C. R.; Hore, P. J.; McLaughlan, K. A. Radiofrequency Magnetic Field on Chemical Reaction Yields. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *329*, 15–22.
- (17) Timmel, C. R.; Hore, P. J. Oscillating Magnetic Field Effects on the Yields of Radical Pair Reactions. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *257*, 401–408.
- (18) Bilecka, I.; Niederberger, M. Microwave Chemistry for Inorganic Nanomaterials Synthesis. *Nanoscale* **2010**, *2* (8), 1358.
- (19) He, P.; Haswell, S. J.; Fletcher, P. D. I. Microwave-Assisted Suzuki Reactions in a Continuous Flow Capillary Reactor. *Appl. Catal. Gen.* **2004**, *274* (1-2), 111–114.
- (20) Kappe, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (46), 6250–6284.
- (21) Perreux, L.; Loupy, A. A Tentative Rationalization of Microwave Effects in Organic Synthesis according to the Reaction Medium, and Mechanistic Considerations. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9199–9223.
- (22) Cvangros, J.; Toma, S.; Marque, S.; Loupy, A. Synthesis of Phosphonium Salts under Microwave Activation Leaving Group and Phosphine Substituents Effects. *Can. J. Chem.* **2004**, *82* (9), 1365–1371.
- (23) Loupy, A.; Maurel, F.; Sabatié-Gogová, A. Improvements in Diels–Alder Cycloadditions with Some Acetylenic Compounds under Solvent-Free Microwave-Assisted Conditions: Experimental Results and Theoretical Approaches. *Tetrahedron* **2004**, *60* (7), 1683–1691.
- (24) Bogdal, D.; Lukasiewicz, M.; Pielichowski, J.; Miciak, A.; Bednarz, S. Microwave-Assisted Oxidation of Alcohols Using Magtrieve™. *Tetrahedron* **2003**, *59* (5), 649–653.
- (25) Lukasiewicz, M.; Bogdal, D.; Pielichowski, J. Microwave-Assisted Oxidation of Side Chain Arenes by Magtrieve™. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345* (12), 1269–1272.
- (26) Kappe, C. O.; Pieber, B.; Dallinger, D. Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (4), 1088–1094.
- (27) López Rivilli, M. J. Nuevos Derivados Bioactivos de Quinolonas. Síntesis Y Estudio de Su Comportamiento En El Receptor de Las Benzodiazepinas. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 2010.
- (28) López Rivilli, M. J.; Moyano, E. L.; Yranzo, G. I. An Alternative Approach toward 2-Aryl-2H-pyrazolo[4,3-C]-Quinolin-3-Ones by a Multistep Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (3), 478–481.

- (29) Gould, R. G.; Jacobs, W. A. The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and 5,6-Benzoquinolines. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2890–2895.
- (30) Kidwai, M.; Bhushan, K. R.; Sapra, P.; Saxena, R. K.; Gupta, R. Alumina-Supported Synthesis of Antibacterial Quinolines Using Microwaves. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (1), 69–72.
- (31) Černuchová, P.; Vo-Thanh, G.; Milata, V.; Loupy, A. Solvent-Free Synthesis of Quinolone Derivatives. *Heterocycles* **2004**, *64*, 177–191.
- (32) Jia, C.-S.; Dong, Y.-W.; Tu, S.-J.; Wang, G.-W. Microwave-Assisted Solvent-Free Synthesis of Substituted 2-Quinolones. *Tetrahedron* **2007**, *63* (4), 892–897.
- (33) Albrecht, M.; Osetska, O.; Rantanen, T.; Fröhlich, R.; Bolm, C. Microwave-Assisted Preparation of Quinolone and Quinoline Derivatives. *Synlett* **2010**, *7*, 1081–1084.
- (34) Cao, X.; You, Q.-D.; Li, Z.-Y.; Yang, Y.; Wang, X.-J. Microwave-Assisted Simple Synthesis of Substituted 4-Quinolone Derivatives. *Synth. Commun.* **2009**, *39* (24), 4375–4383.
- (35) Razzaq, T.; Kappe, C. O. Rapid Preparation of Pyranoquinolines Using Microwave Dielectric Heating in Combination with Fractional Product Distillation. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (14), 2513–2517.
- (36) Ding, D.; Li, X.; Wang, X.; Du, Y.; Shen, J. Microwave-Assisted Rapid and Straightforward Synthesis of 2-Aryl-4-Quinolones from Acylated 2'-Aminoacetophenones. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (39), 6997–6999.
- (37) Bougrin, K.; Loupy, A.; Soufiaoui, M. Microwave-Assisted Solvent-Free Heterocyclic Synthesis. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2005**, *6*, 139–167.
- (38) Westman, J. Speed and Efficiency in the Production of Diverse Structures: Microwave-Assisted Multi-Component Reactions. In *Microwave Assisted Organic Synthesis*; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, 2005.
- (39) Stadler, A.; Pichler, S.; Horeis, G.; Kappe, C. O. Microwave-Enhanced Reactions under Open and Closed Vessel Conditions. A Case Study. *Tetrahedron* **2002**, *58* (16), 3177–3183.
- (40) Lange, J. H.; Verveer, P. C.; Osnabrug, S. J.; Visser, G. M. Rapid Microwave-Enhanced Synthesis of 4-Hydroxyquinolinones under Solvent-Free Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (7), 1367–1369.
- (41) Malvacio, I.; Vera, D. M. A.; Moyano, E. L. Microwave Assisted Synthesis of Ethyl-Quinolone-4-One-3-Carboxylates and Hydrolysis to Quinolone-4-One-3-Carboxylic Acids. *Curr. Microw. Chem.* **2014**, *1*, 52–58.
- (42) Robert, A.; Dechy-Cabaret, O.; Cazelles, J.; Meunier, B. From Mechanistic Studies on Artemisinin Derivatives to New Modular Antimalarial Drugs. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35* (3), 167–174.
- (43) Foley, M.; Tilley, L. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacol. Ther.* **1998**, *79* (1), 55–87.
- (44) Zhang, Y.; Guiguemde, W. A.; Sigal, M.; Zhu, F.; Connelly, M. C.; Nwaka, S.; Guy, R. K. Synthesis and Structure–activity

- Relationships of Antimalarial 4-Oxo-3-Carboxyl Quinolones. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (7), 2756–2766.
- (45) Hiltensperger, G.; Jones, N. G.; Niedermeier, S.; Stich, A.; Kaiser, M.; Jung, J.; Puhl, S.; Damme, A.; Braunschweig, H.; Meinel, L.; et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of New Quinolone-Type Molecules against *Trypanosoma Brucei*. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (6), 2538–2548.
- (46) Gao, W.; Zhang, C.; Li, Y. A Novel One-Pot Three-Step Synthesis of 2-(1-Benzofuran-2-Yl) Quinoline-3-Carboxylic Acid Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21* (5), 806–812.
- (47) Pasquini, S.; De Rosa, M.; Ligresti, A.; Mugnaini, C.; Brizzi, A.; Caradonna, N. P.; Cascio, M. G.; Bolognini, D.; Pertwee, R. G.; Di Marzo, V.; et al. Investigations on the 4-Quinolone-3-Carboxylic Acid Motif. 6. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 7-Substituted Quinolone-3-Carboxamide Derivatives as High Affinity Ligands for Cannabinoid Receptors. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 30–43.
- (48) Srivastava, N.; Kumar, A. Synthesis and Study of 1-Ethyl-3-Carbohydrazide and 3-[1-Oxo-2-Hydrazino-3-(p-Toluenesulfon)]quinolone Derivatives against Bacterial Infections. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 464–468.
- (49) Strauss, C. R.; Rooney, D. W. Accounting for Clean, Fast and High Yielding Reactions under Microwave Conditions. *Green Chem.* **2010**, *12* (8), 1340.

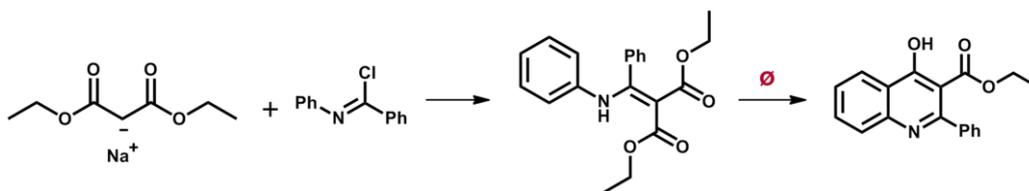


Síntesis de quinolin-4-onas por FVP. Estudio del mecanismo de reacción en fase gaseosa



2.1.1. La reacción de Gould-Jacobs

En 1885 Just reportó la reacción entre dietilmalonato de sodio y cloruro de *N*-fenilbencimino dando lugar al malonato correspondiente, el cual posteriormente cicló para obtenerse el anillo de quinolona (Esquema 2.1).¹

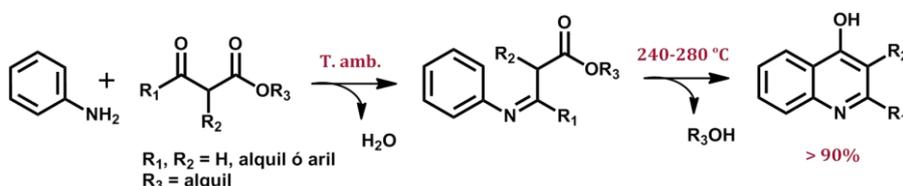


Esquema 2.1. Síntesis de 3-carboetoxi-2-fenil-4-hidroxiquinolina.

2.1.

Introducción

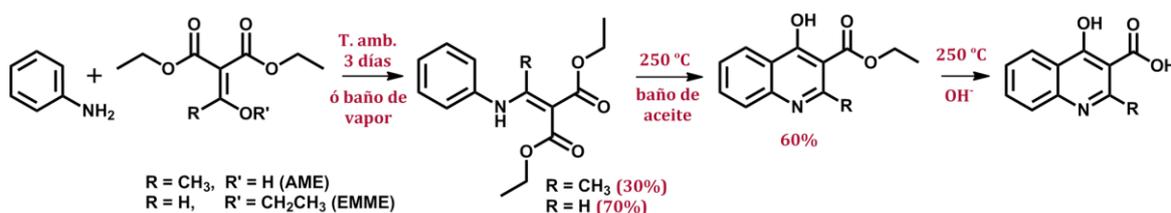
Luego, en 1887 Conrad y Limpach desarrollaron la síntesis de quinolinas partiendo de anilinas y β -cetoésteres, a través de una base de Schiff (Esquema 2.2).²



Esquema 2.2. Síntesis de Conrad-Limpach.

Aunque estos trabajos sentaron un antecedente importante en la síntesis de quinolonas, pasaron varias décadas sin continuar los estudios en el área.

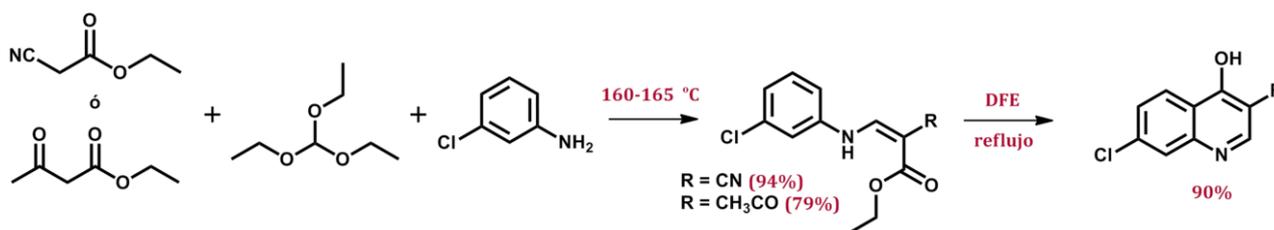
Fue recién en 1939 cuando Gould y Jacobs (G-J) retomaron la síntesis de estos núcleos a partir de la condensación de anilinas con éster acetomalónico (AME) ó etoximetilenmalonato de dietilo (EMME). Seguido a la ciclización del éster anilinetilmalónico en aceite mineral a 250 °C, se obtuvieron los ésteres de quinolonas, los cuales posteriormente fueron transformados a ácidos mediante saponificación (Esquema 2.3).³



Esquema 2.3. Síntesis de hidroxiquinolinas aplicando la reacción de Gould-Jacobs.

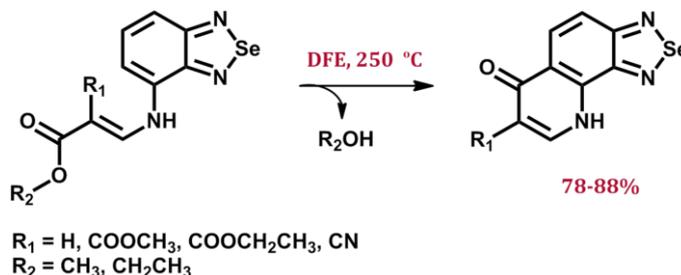
Siete años más tarde, debido a la necesidad de encontrar drogas antimaláricas, los investigadores continuaron realizando mejoras en la síntesis de G-J. Entonces, para la etapa de ciclización, se reemplazó el aceite mineral por otros solventes inertes y de alto punto de ebullición como Dowtherm™ (una mezcla de DFE y difenilo), o simplemente DFE, difenilmetano, parafina y DCB entre otros. Una vez llevada a cabo la saponificación de la quinolona, la mayoría de estos solventes también fueron utilizados para producir la descarboxilación del derivado ácido, ya que para este proceso se necesitan temperaturas cercanas a los 300 °C.^{1,4,5}

Desde su primera aplicación en 1939, la reacción de G-J comenzó a ser una de las metodologías sintéticas más usadas para la obtención de núcleos de quinolona. Así, se amplió la utilidad de la misma realizando la condensación de trietilortoformiato con éster cianoacético y acetoacético en presencia de *m*-cloroanilina dando el correspondiente anilinoacrilato, el cual luego cicla a quinolona dejando el grupo ciano o acetilo en posición 3, lo que indicaría que el ataque ocurre en el carbono del éster y no en el carbono del grupo ciano o de la cetona (Esquema 2.4).^{1,4}

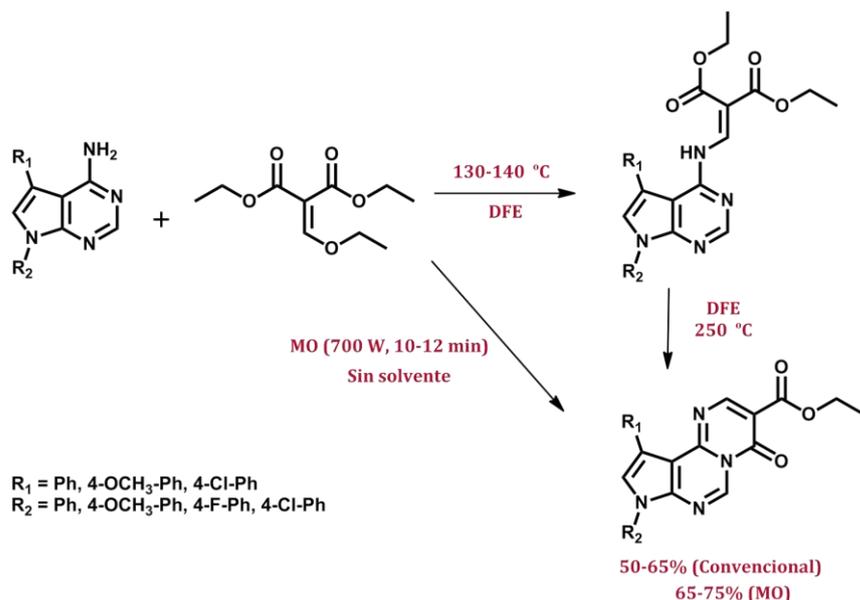


Esquema 2.4. Utilización de la metodología de G-J en la síntesis de quinolinas.

Como la reacción anterior, se pueden citar varios ejemplos de la metodología de G-J aplicada a la síntesis de derivados de quinolona como selenadiazoloquinolonas (Esquema 2.5),⁶ pirimidopirrolpirimidinas (Esquema 2.6)⁷ y piridoquinoxalinas⁸ entre otras.

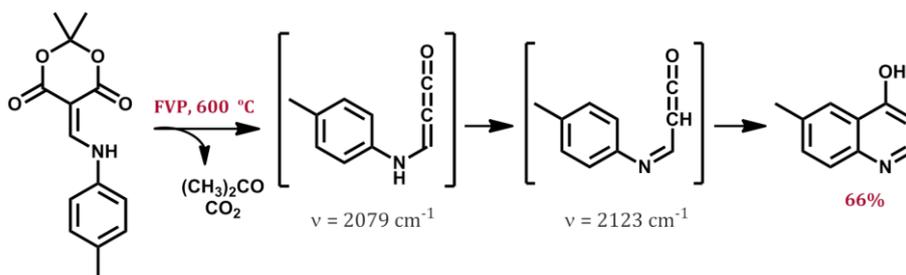


Esquema 2.5. Síntesis de selenadiazoloquinolonas.



Esquema 2.6. Síntesis de pirimidopirrolpirimidinas.

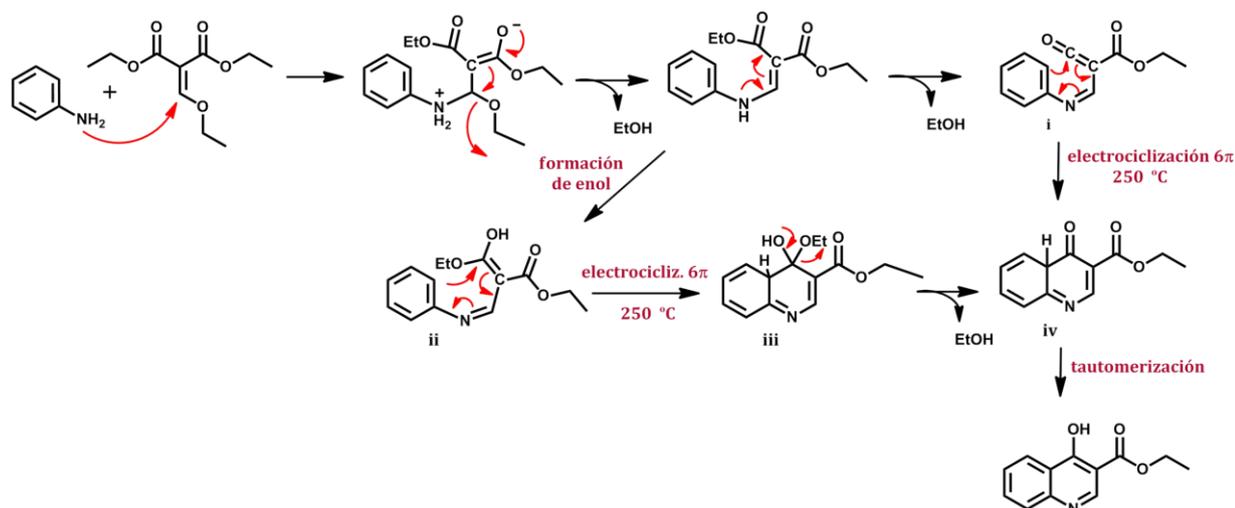
El mecanismo de la reacción de G-J propuesto hasta el momento se basa en el antecedente de Conrad y Limpach² y en posibles intermediarios detectados mediante espectroscopía IR en la *flash vacuum pyrolysis* (FVP) de ácidos de Meldrum, sugiriendo la formación de un intermediario ceteno previo a la ciclización (Esquema 2.7).⁹



Esquema 2.7. Síntesis de quinolinas por FVP de ácidos de Meldrum e intermediarios detectados por espectroscopía IR.

Se propuso entonces que la reacción de G-J comenzaría con la condensación de la arilamina con AME o EMME y eliminación de alcohol para dar el β -anilinoacrilato. Este intermediario forma las especies **i** y **ii** a altas temperaturas, las cuales mediante electrociclización 6π forman las especies **iv** y **iii** respectivamente. La pérdida de etanol de **iii** puede dar el intermediario **iv**, el cual finalmente tautomeriza a la 3-carboetoxi-4-hidroxiquinolina (Esquema 2.8).^{1,3}

A pesar de que la reacción de G-J ha sido ampliamente utilizada como metodología sintética en solución, existen solo unos pocos reportes de la aplicación de la misma en



Esquema 2.8. Mecanismo de la reacción de G-J propuesto en los antecedentes.

sistemas de flujo,¹⁰⁻¹² y no se conocen aún estudios de la misma por FVP. Es por tal motivo que surgió el principal objetivo de este capítulo: el estudio teórico-experimental en fase gaseosa del mecanismo de G-J, aplicado a la formación de quinolin-4-onas.

2.1.2. Reacciones térmicas

2.1.2.a. Orígenes de las reacciones térmicas

Se conoce que el calentamiento de una sustancia a altas temperaturas conduce a su descomposición debido a que los enlaces químicos poseen una dada estabilidad térmica. Este tipo de degradación genera comúnmente fragmentos más pequeños que, a su vez, pueden interactuar formando nuevas moléculas incluso más grandes y/o complejas que la de partida.

A partir del análisis de los intermediarios y productos, es posible además, obtener un gran volumen de información sobre la estructura y la reactividad del sustrato por lo que no es de extrañar que innumerables transformaciones y sustancias hayan sido reveladas de este modo en la historia de la química. Tal es el caso del descubrimiento del fósforo por destilación destructiva de residuos de la orina por Brandt (1669), el aislamiento de benceno desde vapores de aceite por Faraday (1825) y el descubrimiento del pirrol por pirólisis de huesos, por Runge (1834).¹³

Posteriormente, con el descubrimiento de métodos más sofisticados para el aislamiento y la síntesis de nuevos compuestos, la pirólisis perdió importancia en la química

sintética. A medida que las moléculas se volvían más grandes y complejas, los métodos pirolíticos no eran lo suficientemente adecuados para lograr buenos rendimientos de conversión, además de aumentar la dificultad a la hora de determinar las estructuras de los productos.

Sin embargo, a partir de 1950, con la incorporación de nuevas técnicas analíticas y espectroscópicas, se incrementó considerablemente el interés de los métodos pirolíticos para el estudio de las transformaciones de un gran número de compuestos orgánicos. El acoplamiento de equipos espectroscópicos a los sistemas de pirólisis permitió y facilitó el estudio de intermediarios reactivos como radicales, carbenos y nitrenos. A su vez, el desarrollo de la química teórica comenzaba a proveer explicaciones mecanísticas para los procesos térmicos observados. La aplicación de la teoría de Orbitales Moleculares y el enunciado de las reglas de Woodward-Hoffman (1965-1969) permitieron a los científicos explorar el comportamiento observado para una gran variedad de sustancias y comparar los procesos térmicos con los fotoquímicos.^{13,14}

Excelentes publicaciones han aparecido en las últimas décadas, tales como las realizadas por Brown¹³ y Vallée¹⁵ en las que se describen varios métodos pirolíticos junto a un detallado resumen de los más importantes tipos de reacciones estudiadas bajo estas condiciones.

2.1.2.b. Tipos de reacciones térmicas

Es apropiado definir como termólisis al proceso espontáneo y no catalizado de compuestos orgánicos iniciado sólo por energía térmica o calor. En tanto, cuando estos procesos se llevan a cabo a temperaturas por encima de los 300 °C, se denomina **pirólisis**.¹⁶ Sin embargo, actualmente muchos autores consideran como sinónimos los términos **reacciones térmicas, termólisis y pirólisis**.

Por lo general, cuando se realiza una reacción térmica, el resultado final consiste en una mezcla compleja de productos. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de reacción se pueden detectar en el pirolizado (crudo de reacción) diferentes productos de descomposición directa del material de partida o productos resultantes de reacciones subsecuentes de los distintos componentes del pirolizado. De acuerdo a los productos que se deseen obtener se pueden emplear dos sistemas distintos de pirólisis: **sistemas estáticos** y **sistemas dinámicos**.

En los experimentos en **sistema estático** la muestra permanece a la temperatura de trabajo por un período de minutos a horas. Como consecuencia, los incipientes productos de reacción (primarios) pueden sufrir reacciones posteriores generando productos derivados (secundarios) obteniendo, finalmente, una mezcla de productos primarios, secundarios, terciarios, etc. Puede ocurrir también que sólo se obtengan los productos finales en ausencia de los intermediarios ya que la permanencia de estos últimos en el sistema dependerá de su estabilidad térmica, lo cual es consecuencia tanto de la estabilidad termodinámica como de la reactividad cinética de la molécula.

Otro aspecto diferencial de los sistemas estáticos es la posibilidad de reacciones bimoleculares que derivan del encuentro en un mismo espacio de las moléculas activadas o de intermediarios de reacción (por ejemplo radicales). Los ejemplos clásicos de sistemas estáticos son la termólisis en solución (reflujo de solventes) o en fase condensada.¹⁷

De manera opuesta, los **sistemas dinámicos o de flujo** permiten la remoción de los productos primarios de reacción de la zona caliente. Por ende, los pirolizados suelen presentar gran simplicidad. Además, en estos sistemas los procesos bimoleculares pueden ser minimizados ajustando el tiempo de contacto de las moléculas con el calor; dichos procesos unimoleculares son posibles cuando las moléculas se encuentran en fase gaseosa.

Una importante distinción dentro de los sistemas de pirólisis dinámicos se realiza en base al tiempo de residencia o de contacto de la muestra con el calor. Cuando estos tiempos son del orden de los minutos (1-8 min) el sistema se puede denominar Pirólisis Lenta (*Slow Pyrolysis*). Para tiempos entre 10 a 0,5 s el sistema corresponde a Pirólisis Rápida (*Fast Pyrolysis*) mientras que tiempos muy cortos, menores a 0,5 s, implican una Pirólisis Muy Rápida (*Flash Pyrolysis*). Por lo general, para un determinado proceso a medida que se disminuye el tiempo de contacto, la temperatura de reacción se incrementa.

Las reacciones de pirólisis pueden llevarse a cabo tanto en fase sólida, líquida o gaseosa, siendo las más comunes aquellas en fase líquida o sólida. Si se realizan en fase gaseosa se debe tener en cuenta que el sistema, además de estar a altas temperaturas, debe ser sometido a bajas presiones (para permitir el cambio de fase de un sólido o líquido a vapor). Esto hace necesario considerar dos tipos de

posibilidades para las **reacciones térmicas en fase gaseosa**; una es **en sistema estático** y la otra **en sistema dinámico al vacío**, lo que en inglés se conoce como **Flash Vacuum Pyrolysis (FVP)**.

Los experimentos en fase gaseosa que se detallarán en esta tesis doctoral se realizaron en un sistema dinámico al vacío de tipo FVP. Esta técnica presenta características y parámetros específicos que le confieren grandes ventajas sobre otros métodos, tanto desde el punto de vista sintético como del estudio mecanístico.¹⁸

2.1.3. Características y aplicaciones de la *Flash Vacuum Pyrolysis (FVP)*

2.1.3.a. *Diseño experimental*

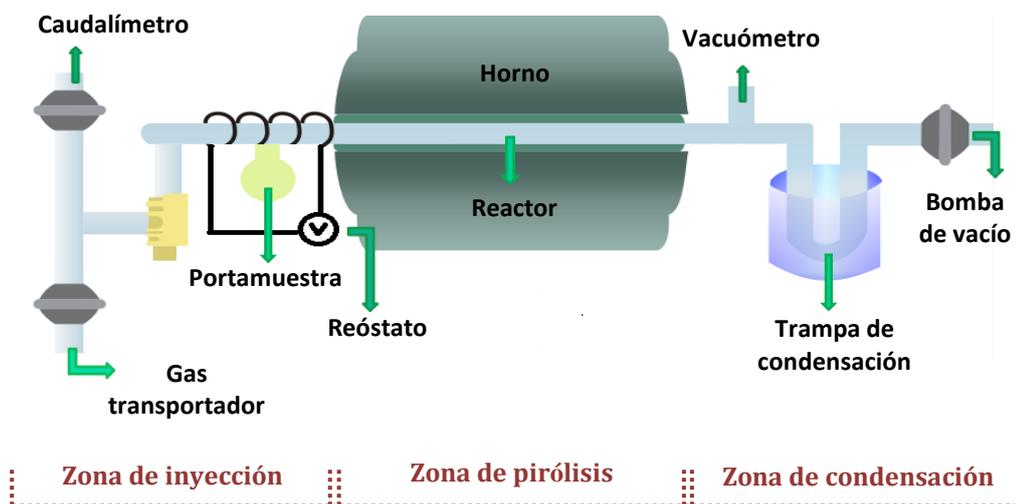
Los procesos de FVP comprenden la sublimación o destilación de un sustrato para ser transportado a una zona caliente (generalmente entre 300-1000 °C) en donde las moléculas gaseosas sufren una excitación térmica (*shock* térmico) y los productos son luego rápidamente enfriados.¹⁷

El equipo de FVP utilizado se representa en la Figura 2.1 y está compuesto por tres partes principales:

- **Zona de inyección de la muestra:** en ella se realiza la volatilización del sustrato (en estado sólido o líquido) y se favorece su ingreso a la zona caliente con el uso de un gas transportador inerte (N₂, Ar, He). Esta sección del equipo está compuesta por un caudalímetro para medir el flujo de gas transportador y un portamuestra que puede ser calefaccionado de modo de facilitar la volatilización de los sustratos con baja presión de vapor.
- **Zona de termólisis:** está constituida por el horno propiamente dicho. En el interior del mismo se coloca un reactor (tubo cilíndrico) de cuarzo o Pyrex dependiendo de las temperaturas de trabajo. Además, el horno de pirólisis posee un controlador interno de temperatura que permite regular las fluctuaciones de temperatura durante las reacciones. El regulador posee un error de ± 1 °C que provee una adecuada reproducibilidad para este tipo de técnica.
- **Zona de condensación de los productos:** está constituida por una trampa en forma de “U” sumergida en líquidos criogénicos (a temperaturas por debajo de -170 °C) que permite condensar los productos inmediatamente después de que abandonan la zona caliente. Esta trampa se encuentra conectada a su vez a una línea de vacío. En algunos

Figura 2.1.

Equipo de *Flash Vacuum Pyrolysis* (FVP).



experimentos es necesario conectar dos trampas en serie para lograr condensar los productos más volátiles y realizar luego el análisis de la fracción gaseosa.

Es importante agregar que antes de comenzar a utilizar el reactor, es necesario desactivar las paredes del mismo con el objeto de minimizar la catálisis superficial del vidrio que pudiera ocurrir a altas temperaturas. Para ello se realiza una reacción de pirólisis de bromuro de alilo a 550 °C para generar de esta manera un recubrimiento o depósito de carbón sobre sus paredes.

El propósito del diseño experimental de los equipos de FVP es aislar los productos primarios resultantes de una reacción unimolecular. El ingreso de un flujo continuo de reactivo a bajas presiones permiten que el tiempo de exposición de las moléculas con el calor sea lo suficientemente pequeño para inhibir reacciones secundarias bimoleculares. Además, la condensación de los productos a bajas temperaturas detiene todo tipo de reacción posterior, evitando procesos subsecuentes a los generados en la zona caliente.

2.1.3.b. Características

Algunas de las principales características que presenta esta metodología se mencionan a continuación:

- **No se utilizan solventes**, por lo tanto no existe la limitación del punto de ebullición del mismo y se pueden utilizar temperaturas en el intervalo de 300-1000 °C. Además, esto permite la manipulación directa de los

productos de reacción y que el procesamiento del pirolizado sea más sencillo y sustentable.

- Las reacciones transcurren con **cortos tiempos de contacto (τ)** (10^{-2} - 10^{-3} s), el cual se define como el tiempo real que las moléculas están en la zona caliente. Ésta es la característica principal y el valor de τ puede variar dependiendo de la presión y del flujo de gas transportador utilizado para llevar a cabo la reacción.
- Comúnmente se utiliza un **gas transportador** (N_2 , He, Ar) y en algunos casos un reactivo que permita atrapar y/o detectar algún intermediario de reacción (tolueno, furano, etc.).
- Se emplean **bajas presiones** en el sistema, generalmente alrededor de 10^{-2} Torr.
- Al emplear **temperaturas muy altas** se pueden llevar a cabo reacciones que posean altas energías de activación. Las altas energías dan lugar, además, a la formación de intermediarios altamente reactivos (carbenos, nitrenos, radicales y dirradicales) que pueden ser atrapados y estudiados.
- **Predominan las reacciones unimoleculares**, ya que las reacciones entre las moléculas del sustrato están minimizadas por las bajas presiones utilizadas y la dilución del sustrato en el gas transportador (la presión parcial del sustrato es mucho menor a la presión parcial del gas inerte). Entre las transformaciones posibles se encuentran reacciones concertadas, fragmentaciones, extrusión de moléculas pequeñas y reacciones radicalarias.

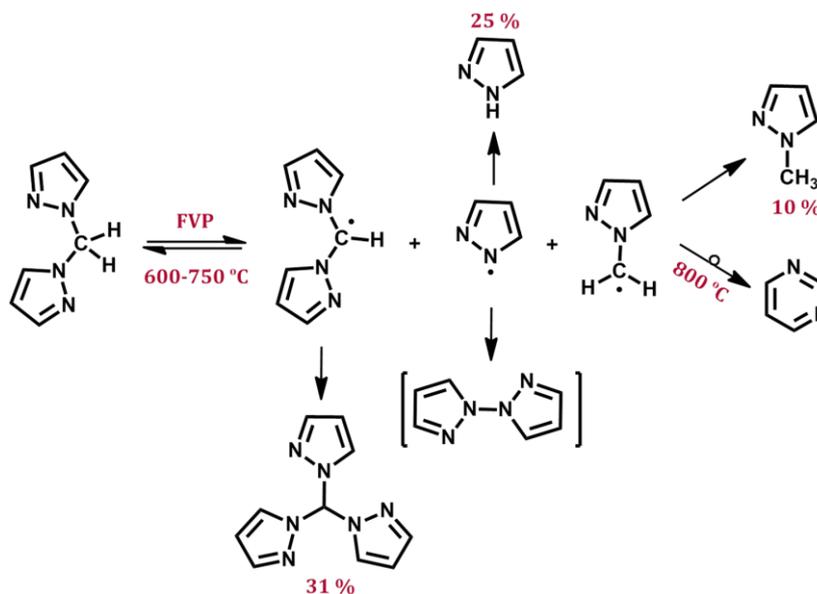
2.1.3.c. Principales reacciones

Como se mencionó anteriormente, los sistemas de FVP se caracterizan por favorecer las reacciones unimoleculares y, esta particularidad ha sido de gran utilidad para el estudio de mecanismos de reacción y como metodología sintética de una gran variedad de compuestos.

Las principales reacciones que predominan en estos sistemas son las que se detallan a continuación:

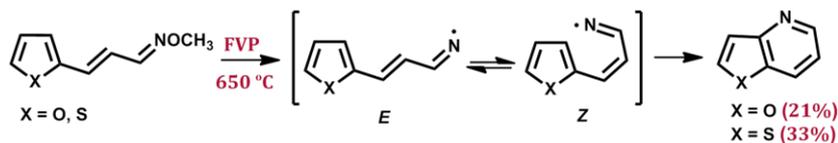
- **Reacciones radicalarias:** generalmente iniciadas por ruptura homolítica del enlace simple más débil que posee el sustrato. En efecto, se puede decir que cada molécula lleva su propio generador de radicales. Por ejemplo, en la pirólisis de *bis*(pirazol-1-il)metano se forman diferentes radicales provenientes de la ruptura homolítica del enlace C-H y del

enlace C-N. Estos radicales pueden abstraer hidrógeno, generando pirazol y 1-metil-pirazol, o bien reaccionar entre sí para formar productos como *tris*(pirazol-1-il)metano y 1,1'-bipirazol (no detectado). A mayores temperaturas ($\sim 800\text{ }^\circ\text{C}$), se observó además la formación del anillo de pirimidina, proveniente del reordenamiento del radical 1-metil-pirazol (Esquema 2.9).¹⁹



Esquema 2.9. Generación de radicales y formación de nuevos productos por FVP de *bis*(pirazol-1-il)metano.

La mayoría de estas reacciones son oxidativas y muchas ciclizaciones involucran la pérdida de un átomo de hidrógeno como paso final de reacción. Un ejemplo de una reacción radicalaria en sistema de FVP con fines sintéticos es la síntesis de piridinas fusionadas a partir de éteres de oxima (Esquema 2.10). Esta reacción ocurre a través de la



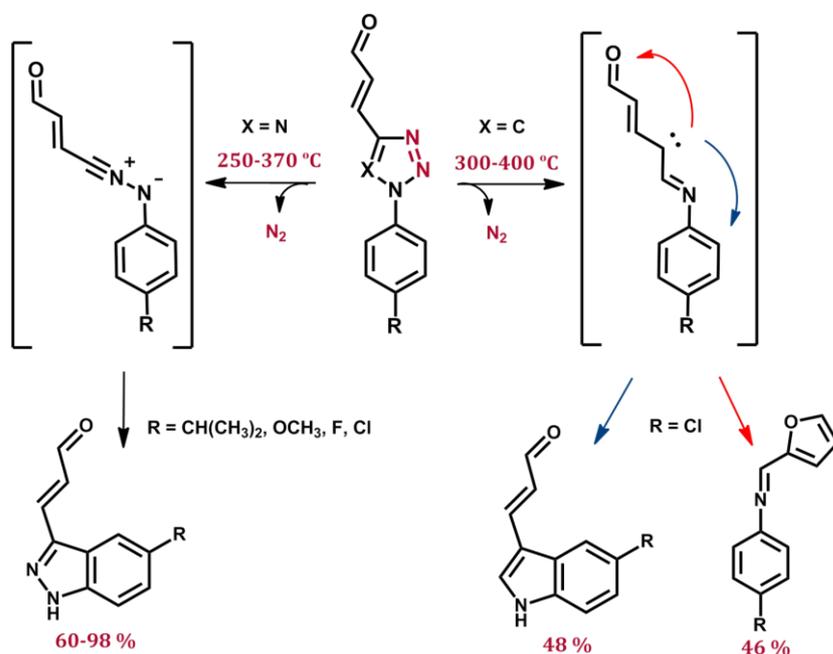
Esquema 2.10. Formación de piridinas fusionadas.

formación de un radical iminilo, el cual cicla para formar el anillo de piridina.²⁰ El producto final se forma a través del isómero iminilo Z, el cual se encuentra en equilibrio con la especie E, siendo estas isomerizaciones muy comunes en los sistemas de FVP.²¹ Si bien los rendimientos son bajos, el potencial sintético reside en que la isomerización E-Z de los alquenos ocurre bajo las condiciones de pirólisis y el

producto final puede ser aislado fácilmente, lo cual representa una importante ventaja respecto a la síntesis de estos núcleos en solución.

- **Reacciones de eliminación:** son aquellas que involucran la pérdida de moléculas pequeñas X-X (N_2 , H_2), X-Y (CO) o Y-X-Y (CO_2), y también de fragmentos un poco más grandes del sustrato. Estas últimas incluyen eliminación de H-R, H-OR, H-Hal, RCOR y muchas otras especies que son convencionalmente denominadas como eliminaciones.

Un ejemplo de dichas reacciones es la extrusión de nitrógeno en la FVP de acroleinil-1,2,3,4-tetrazoles, la cual da lugar a la formación de un intermediario nitrilimina, seguido de cierre de anillo para dar el correspondiente acroleinilindazol. Sin embargo, se han encontrado resultados sorprendentes cuando el sustrato es acroleinil-1,2,3-triazol, ya que, además de dar como producto acroleinilindazol, también genera furanilmetilen-anilina. La formación competitiva de ambos compuestos se explica mediante un intermediario carbeno (Esquema 2.11).²² Desde el punto de

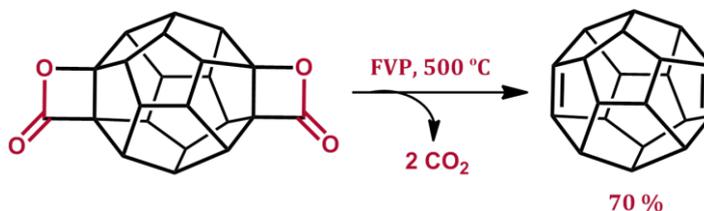


Esquema 2.11. FVP de 1,2,3- y 1,2,3,4-azolilacroleínas.

vista de la síntesis orgánica, dicha metodología es de utilidad para la obtención de acroleinilindazoles con buenos rendimientos (60-98 %).

La FVP ha sido muy poco utilizada para las reacciones de descarboxilación ya que muchas veces éstas ocurren también en solución.^{12,13} Sin embargo, dentro de los ejemplos más comunes se encuentra la descarboxilación, junto con la

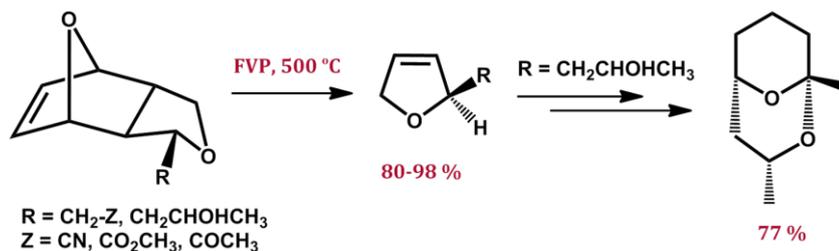
pérdida de acetona, de derivados de ácidos de Meldrum (véase Esquema 2.16). Otro ejemplo a mencionar es la formación de alquenos por descarboxilación de β -lactonas. Esta reacción fue aplicada a la generación de dodecahedradieno por pirólisis de dodecahedra-dilactona (Esquema 2.12).²³



Esquema 2.12. Síntesis de dodecahedradieno por descarboxilación.

- **Reacciones pericíclicas:** se caracterizan por transcurrir a través de un estado de transición cíclico concertado que involucra un movimiento de electrones de un sistema π . Entre las más comunes podemos mencionar: reacciones de Diels-Alder (DA), reordenamientos sigmatrópicos, y electrociclizaciones.

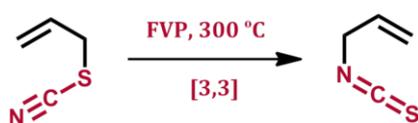
La descomposición térmica de un aducto de DA se conoce como reacción de Retro Diels-Alder (RDA). En general, las reacciones de DA son utilizadas con fines sintéticos y para proteger dobles enlaces o 1,3-dienos. De igual modo, la mayoría de las reacciones de RDA son utilizadas para generar alquenos o dienos, y son también consideradas de gran importancia preparativa.²⁴⁻²⁶ En el Esquema 2.13 se muestra la síntesis de dihidrofuranos enantioméricamente puros, formados por reacción de RDA de éteres tricíclicos a 500 °C.²⁷ Es particular el dihidrofuranpropan-2-ol, generado por esta reacción, es un compuesto de gran interés por ser el precursor del éter bicíclico bioactivo (1*R*,3*R*,5*S*)-1,3-dimetil-2,9-dioxabicyclo[3.3.1]nonano.



Esquema 2.13. RDA de éteres tricíclicos por FVP.

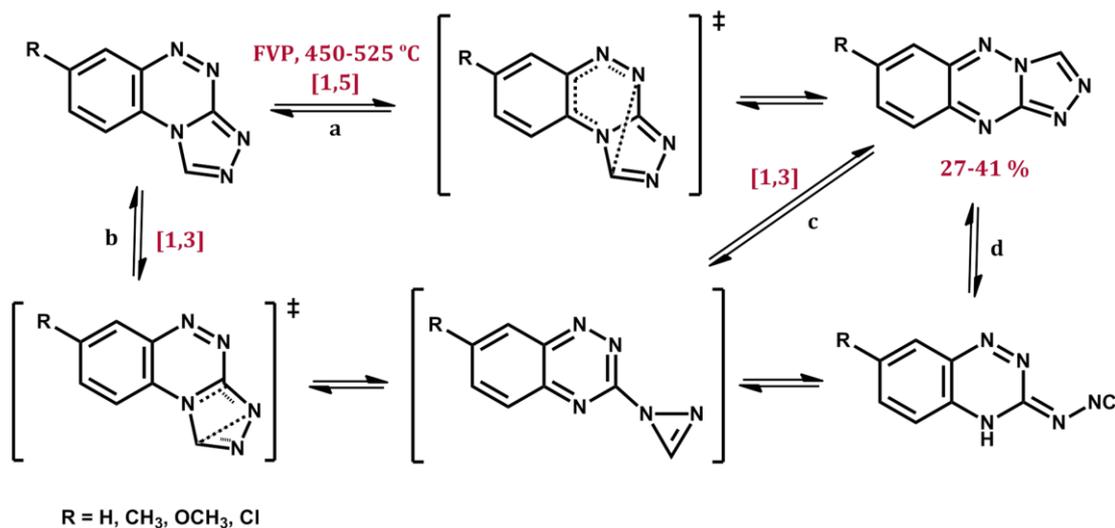
Por otra parte, las transposiciones sigmatrópicas constituyen otro tipo de reacciones muy frecuentes en FVP y

han resultado de gran utilidad para la síntesis de productos difíciles de obtener por la metodología convencional. Un proceso sigmatrópico [i,j] involucra una reorganización concertada de electrones, en la cual un grupo unido por un enlace σ (adyacente a uno o varios sistemas π) migra hacia una nueva posición mediante una reacción intramolecular no catalizada. El orden [i,j] especifica el número de átomos en el fragmento migrante y el número de átomos en el sistema π que están directamente involucrados en el cambio de conectividad. Por ejemplo, en sistemas de FVP se ha observado que la reacción de isomerización de aliltiocianato a alilisotiocianato transcurre a través de un corrimiento sigmatrópico [3,3] del fragmento tiociano (Esquema 2.14).²⁸



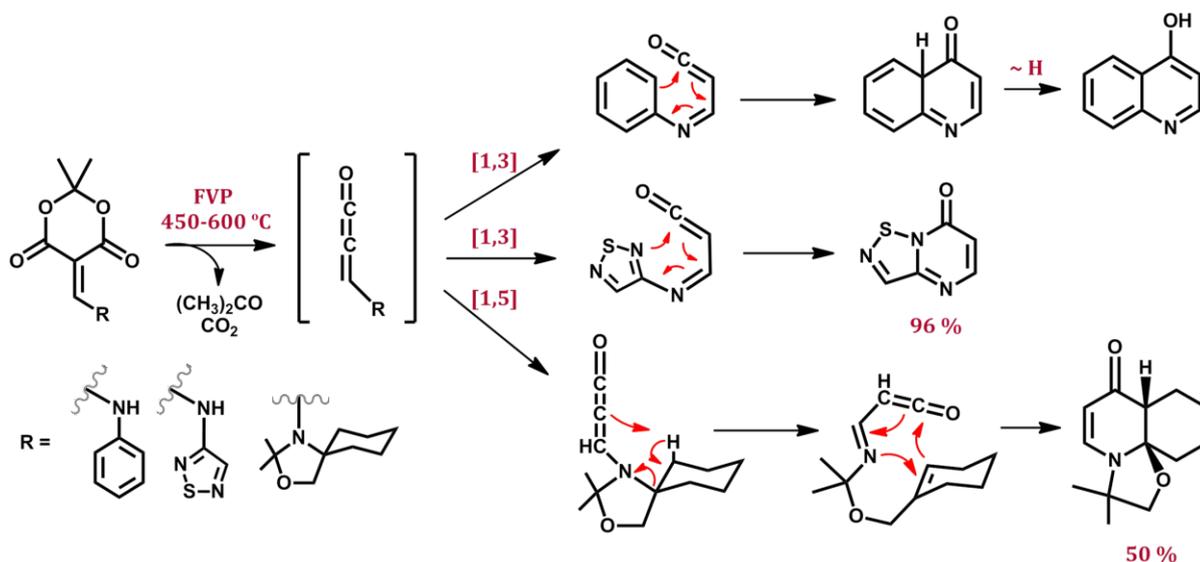
Esquema 2.14. Isomerización de aliltiocianato a través de un proceso sigmatrópico [3,3].

Los corrimientos sigmatrópicos [1,j] también son procesos muy observados en pirólisis, como es la isomerización del núcleo tetrazol-benzotriazina angular a su isómero lineal (Esquema 2.15). Esta reacción ocurre a través de un corrimiento sigmatrópico concertado [1,5] con rotación del enlace C-N (*vía a*); o bien, por una migración [1,3] con contracción de anillo (*vía b*), formando una diazirina antiaromática (muy inestable para ser aislada), la cual luego, da lugar al producto final (*vías c y d*).²⁹



Esquema 2.15. Isomerización de tetrazol-benzotriazinas a través de corrimientos sigmatrópicos [1,j].

Los derivados de ácidos de Meldrum son precursores de una gran variedad de heterociclos fusionados bioactivos como quinolinas,^{9,30} tiadiazolpirimidinonas¹² y pirrolizinsonas,³¹ entre otros. Una de las aplicaciones sintéticas más interesantes de la pirólisis de estos ácidos es a partir de metilen-derivados como los mostrados en el Esquema 2.16. En estas reacciones se obtiene un intermediario metilencetena con co-formación de acetona y dióxido de carbono. Una vez formada la metilencetena, ésta genera iminocetena por transposición de hidrógeno [1,3], [1,4], [1,5], [1,6] ó [1,7], dependiendo de la naturaleza del sustituyente R. Por ejemplo, la formación de fenilamino-metilencetena y tiadiazol-3-amino-metilencetena ocurre a través de una migración [1,3]; mientras que el oxazolidin-derivado lo hace por medio de una transposición [1,5]. Posteriormente, la iminocetena sufre una reacción de cicloadición de DA intramolecular dando el producto final (Esquema 2.16).³¹



Esquema 2.16. Formación de anillos fusionados por FVP de ácidos de Meldrum.

2.1.4. Métodos computacionales para el estudio de mecanismos

La química computacional es una rama de la química que utiliza simulaciones computacionales para resolver problemas químicos, ya sea complementando la información obtenida experimentalmente o, en algunos casos, para predecir fenómenos no observados hasta la fecha.

Es importante destacar que el tiempo de cálculo aumenta rápidamente a medida que el tamaño del sistema estudiado

crece. Es por ello que, dependiendo del sistema en estudio, se pueden utilizar desde métodos basados en teorías de alta precisión, pero apropiados para sistemas pequeños, hasta métodos que recurren a las aproximaciones, pero apropiados para grandes sistemas. Los métodos más precisos son llamados **métodos *ab initio***, los cuales están basados totalmente en la teoría de los primeros principios. Los menos precisos son llamados **empíricos** o **semi-empíricos**, debido a que son obtenidos de resultados experimentales. Existen también los métodos basados en la **teoría del funcional de la densidad**, más comúnmente conocidos como **DFT** por sus siglas en inglés: *Density Functional Theory*. Estos últimos son a menudo considerados como métodos *ab initio*, aunque muchos de sus funcionales usan parámetros derivados de la data empírica, por lo que deberían también ser llamados como semi-empíricos. Por tal motivo, es mejor tratarlos como una clase individual.

A continuación se describen brevemente los métodos utilizados en este capítulo para el estudio del mecanismo de formación en fase gaseosa de quinolin-4-onas.

2.1.4.a. Density Functional Theory (DFT)

Los métodos basados en la teoría del funcional de la densidad pertenecen a los métodos cuánticos, los cuales intentan aportar soluciones a la ecuación de Schrödinger, la ecuación fundamental de la mecánica cuántica que describe cualquier sistema químico.

Los aportes más relevantes de esta teoría se originan a partir del trabajo de Hartree y Fock (HF), cuyo método asume que la función de onda exacta de un sistema de N cuerpos puede ser aproximada por un solo determinante de Slater de N orbitales de espín. Al invocar el principio variacional se puede derivar un set de N ecuaciones para N orbitales de espín y, resolviendo estas ecuaciones se obtiene la función de onda de HF y la energía del sistema. La principal limitación del método de HF es que trata a los electrones como si se movieran independientemente uno del otro, es decir, no tiene en cuenta la correlación electrónica. Por lo tanto, HF es principalmente utilizado como punto de partida para aproximaciones cuánticas más elaboradas de tipo "post-HF" (*ab initio*).³²

Los métodos DFT permiten calcular la energía de un sistema incluyendo la correlación electrónica, pero mediante un procedimiento alternativo. La base de esta teoría se basa

en el teorema de Hohenberg-Kohn, el cual afirma que la energía del estado electrónico fundamental de un sistema puede determinarse si se conoce su densidad electrónica (ρ). Es decir, la energía es un funcional de la densidad y se expresa de la siguiente forma:

$$E(\rho) = T(\rho) + E_{en}(\rho) + E_{ee}(\rho) \quad \text{Ec. 2.1.}$$

donde $T(\rho)$ representa la energía cinética, $E_{en}(\rho)$ la energía de interacción electrón-núcleo, y $E_{ee}(\rho)$ la interacción electrón-electrón. Sin embargo, el teorema no dice cuál es la forma exacta del funcional. El gran paso que permitió aplicar este formalismo a la química cuántica fue dado por Kohn y Sham al considerar un sistema de $2N$ electrones sin interactuar descrito por orbitales ψ_i , de forma que la densidad electrónica de este sistema (ρ_s) coincida con la del sistema real (ρ), en el que sí hay interacciones. Así la ecuación (Ec. 2.1) puede reescribirse de la siguiente forma:

$$E(\rho) = T_s(\rho) + E_{en}(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde $T_s(\rho)$ es una aproximación a la energía cinética real ($T(\rho)$) ya que corresponde a la de un sistema de N electrones sin interactuar, $J(\rho)$ es la energía de interacción de Coulomb electrón-electrón clásica y E_{xc} es el denominado término de correlación e intercambio. Puede observarse que $E_{xc}(\rho)$ engloba el resto de la energía cinética, que no se tenía en cuenta en $T_s(\rho)$ por asumir un sistema de partículas independientes, además de la energía de interacción no clásica electrón-electrón.

La principal dificultad en la teoría DFT reside en encontrar expresiones adecuadas para $E_{xc}(\rho)$, pero asumiendo que se conoce dicho funcional el problema a resolver es muy parecido al método de HF. Es decir, se deben resolver las ecuaciones de Kohn-Sham, determinando el conjunto de orbitales ψ_i que minimicen la energía. Si se conociera exactamente $E_{xc}(\rho)$, la resolución de estas ecuaciones daría la energía exacta del estado fundamental de un sistema, incluyendo, por lo tanto, toda la correlación electrónica.^{32,33}

Se han desarrollado distintos tipos de funcionales que permiten calcular las propiedades moleculares con diferentes niveles de exactitud. El funcional más simple es la **aproximación de la densidad local (LDA**, por sus siglas en inglés: *Local Density Approximation*), en la cual se asume que el funcional solo depende de la densidad, tratada como la de

un gas uniforme de electrones. Una mejora a la aproximación LDA se obtiene haciendo que las energías de correlación e intercambio dependan no solo de ρ , sino también del módulo del gradiente de la densidad ($|\nabla\rho|$). Esto da lugar a los llamados **métodos de gradiente generalizado (GGA**, por sus siglas en inglés: *Generalized Gradient Approximations*). En general, estos métodos parten del funcional LDA añadiendo términos de corrección de gradiente.^{32,33} Para el intercambio, cabe destacar el funcional propuesto por Becke (B) en el año 1988,³⁴ y para el funcional de correlación el de Perdew y Wang (PW91) del año 1991.³⁵ Otro funcional de correlación popular es el desarrollado por Lee, Yang y Parr (LYP).³⁶ El mayor desarrollo en la teoría de DFT, fue la introducción de **funcionales híbridos**, los cuales combinan métodos GGA con el intercambio exacto de HF. El más utilizado es el propuesto por Becke (B3), combinado con el funcional de correlación LYP, con lo que toma el nombre de B3LYP. Este método ha demostrado ser adecuado para el cálculo de una gran variedad de sistemas químicos y ha sido ampliamente utilizado para predecir y/o elucidar mecanismos de reacción en química orgánica.^{37,38} Sin embargo, se han identificado algunas limitaciones específicas como ser: la polarizabilidad de cadenas largas, los cálculos de ciertos estados excitados (principalmente aquellos que involucran transferencia de carga) y reacciones de transferencia de cargas entre sistemas isoenergéticos o simétricos. Es por ello que surgió un nuevo funcional híbrido de correlación e intercambio que combina las cualidades de B3LYP y la corrección de largo alcance presentada por Tawada y colaboradores,³⁹ denominado CAM-B3LYP.⁴⁰

Finalmente, cabe destacar que los métodos DFT son una valiosa herramienta para la investigación ya que permiten validar conclusiones propuestas mediante el trabajo experimental, para discernir entre dos o más hipótesis, o bien para predecir comportamientos aún no estudiados. Los cálculos de propiedades moleculares a nivel DFT, como geometría, estructura electrónica y propiedades espectroscópicas entre otras, permiten una buena conexión entre la teoría y los resultados experimentales.

2.1.4.b. Coupled Cluster (CC)

Los métodos *Coupled Cluster* (CC) son también aproximaciones cuánticas que pertenecen a la clase de métodos *ab initio* "post-HF", ya que consideran la correlación

electrónica y otorgan una aproximación más exacta de la función de onda.

En estos métodos la función de onda de un sistema se expresa de la siguiente forma:

$$\psi_{CC} = e^{\hat{T}} \psi_0 \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde ψ_0 es la función de onda de HF y \hat{T} es el operador CC, definido por:

$$\hat{T} = \hat{T}_1 + \hat{T}_2 + \hat{T}_3 + \dots + \hat{T}_N \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde N es el número de electrones del sistema y $\hat{T}_1, \hat{T}_2, \hat{T}_3, \dots$, son los operadores que generan excitaciones simples, dobles, triples, etc. del determinante de Slater del estado fundamental ψ_0 . Es decir:

$$\hat{T}_1 \psi_0 = \sum_i \sum_a t_i^a \psi_i^a \quad \text{Ec. 2.5}$$

$$\hat{T}_2 \psi_0 = \sum_i \sum_{j>i} \sum_a \sum_{b>a} t_{ij}^{ab} \psi_{ij}^{ab} \quad \text{Ec. 2.6}$$

El operador \hat{T}_1 genera mono-excitaciones a base de reemplazar un espín-orbital ocupado i en la función de referencia por un espín-orbital virtual a , mientras que \hat{T}_2 genera los determinantes de las di-excitaciones ψ_{ij}^{ab} , en los que los espín-orbitales ocupados i y j son reemplazados por los espín-orbitales virtuales a y b ; t_i^a y t_{ij}^{ab} son los coeficientes de CC denominados también amplitudes.

Si \hat{T} incluyera todos los operadores hasta \hat{T}_N , se generarían todos los posibles determinantes excitados y la función de onda obtenida equivaldría a la función de onda con interacción de configuración completa (FCI, *Full Configuration Interaction*). Sin embargo, cálculos con la función de onda exacta son demasiados costosos y únicamente pueden realizarse para sistemas muy pequeños. Habitualmente los cálculos CC se realizan incluyendo únicamente en el operador \hat{T} los operadores \hat{T}_1 y \hat{T}_2 , es decir, consideran únicamente las excitaciones simples y dobles (**CCSD**, *Coupled Cluster Singles and Doubles*). Asimismo, si se supone que $\hat{T} = \hat{T}_2$ se obtiene la función **CCD**. En algunos casos el efecto de las excitaciones triples \hat{T}_3 se estima de forma perturbativa, lo que da lugar al método **CCSD(T)**, uno de los métodos actuales más precisos para incluir la correlación electrónica.^{32,41,42}

Si bien la teoría de CC fue desarrollada para resolver problemas en física, ha tenido una gran utilidad en química,

permitiendo un extenso rango de aplicaciones en cuanto a la estructura y propiedades moleculares, estado excitado y espectroscopía entre otras. Hoy en día, esta teoría ofrece los resultados más exactos entre los métodos *ab initio* de estructura electrónica, aunque su aplicación está limitada a sistemas pequeños (moléculas de no más de 20-30 átomos).

Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

- Aplicar la técnica de FVP a la síntesis de quinolin-4-onas a partir de fenilaminometilenmalonatos de dietilo (**M1, 3, 5, 7-8, 12**). Optimizar las condiciones para dicha síntesis.
- Realizar el estudio teórico del mecanismo de la reacción de G-J en fase gaseosa que conduce a la formación de quinolin-4-onas.
- Comparar los cálculos teóricos con los resultados experimentales.

2.2.

Objetivos específicos

2.3.1. Optimización de las condiciones

Como se mencionó anteriormente, la FVP es una herramienta útil para el estudio mecanístico de infinidad de reacciones, especialmente de procesos unimoleculares debido a las condiciones experimentales en las cuales se lleva a cabo la reacción. Por tal motivo, en esta tesis se utilizó la FVP para estudiar el proceso de ciclización de G-J de fenilaminometilenmalonatos de dietilo que conduce a la formación de las quinolin-4-onas. Para ello, los sustratos fueron sintetizados a partir de cantidades equimolares de anilina y EMME empleando 1 min de irradiación de MO como fue descrito en el Capítulo 1 (Etapa 1, Esquema 2.17).

Para la puesta a punto de la reacción de FVP (Etapa 2, Esquema 2.17) se utilizó el derivado 4-cloro-fenilaminometilenmalonato de dietilo (**M7**). Antes de comenzar con las reacciones de pirólisis, se realizó la sublimación del compuesto para conocer la temperatura a la cual sublimar la muestra bajo las condiciones de FVP. Utilizando el equipo descrito en la sección experimental (Figura 2.15), se determinó que la temperatura a la cual sublima **M7** fue ~84 °C. Teniendo en cuenta este valor, luego se realizó una rampa de temperatura vs. voltaje aplicado y se determinó que debía aplicarse un voltaje de 10 V para calentar el

2.3.

Flash Vacuum Pyrolysis (FVP) de fenilaminometilenmalonatos de dietilo para la síntesis de quinolin-4-onas

portamuestra y permitir la sublimación de los fenilamino-metilenmalonatos.

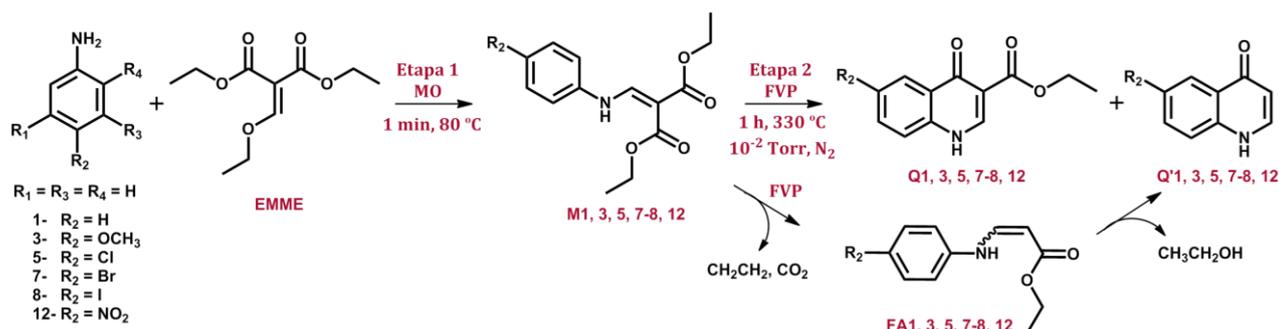
Se realizaron las reacciones de FVP del derivado **M7** cubriendo un rango de temperatura de 250-500 °C (aumentando 50 °C por cada reacción), durante 1 h. La obtención de **Q7** comenzó a observarse a partir de 300 °C, temperatura a la cual, la conversión de sustrato a productos era apreciable (> 80 %). No obstante, la desaparición total de sustrato se observó entre 350 y 400 °C. Sin embargo, a esas temperaturas, un aumento en la formación de subproductos fue detectado. Por lo tanto, se estableció que la temperatura óptima para la ciclización de fenilaminometilenmalonatos hacia producto quinolin-4-onas fue de 330 °C.

2.3.2. Reacciones de ciclización de fenilamino-metilenmalonatos de dietilo

Una vez optimizada la temperatura de trabajo, se llevaron a cabo las reacciones de FVP de los fenilamino-metilenmalonatos de dietilo sin sustituir (**M1**) y sustituidos en posición 4 (**M3, 5, 7-8, 12**).

En todos los casos, al finalizar la reacción, los productos fueron extraídos de la trampa de condensación utilizando acetona. Esto dio lugar a la obtención de dos fracciones: una fracción de productos insolubles (PI), y otra, de productos solubles en ese solvente (PS). Ambas fracciones fueron separadas por filtración y analizadas independientemente.

Mediante espectroscopía de RMN ¹H se determinó que la fracción PI estaba enriquecida en 3-carboetoxi-quinolin-4-ona (**Q**), además de contener el producto de descarboxilación quinolin-4-ona (**Q'**); a excepción del derivado nitro (**M12**), en cuyo caso el producto mayoritario fue **Q'**. Por el contrario, la fracción PS contenía principalmente el producto de descarboxilación (**Q'**), además de sustrato de partida (**M**) y otros productos minoritarios entre los que pudo detectarse 3-(fenilamino)acrilato (**FA**) (Esquema 2.17, Tabla 2.1).



Esquema 2.17. Síntesis de derivados quinolin-4-ona por FVP.

Tabla 2.1. FVP de fenilaminometilmalonatos de dietilo (**M**) a 330 °C.

Comp.	R ₂	Relación de masa (PI:PS) ^a	Relación molar PI (%) ^b		Relación molar PS (%) ^b			
			Q	Q'	M	Q	Q'	Otros
M1	H	63:37	93	7	23	-	42	35
M3	OCH ₃	60:40	95	5	12	46	25	17
M5	Cl	60:40	78	22	1	47	51	-
M7	Br	51:49	87	13	2	-	65	33
M8	I	56:44	86	14	22	-	67	11
M12	NO ₂	35:65	23	77	8	-	78	14

a- Balance de masa promedio 60 %. **b-** Valores calculados a partir del análisis de RMN ¹H. **PI:** productos insolubles, **PS:** productos solubles en acetona.

Los resultados de FVP demostraron que es posible la reacción de G-J de **M** bajo las condiciones estudiadas. Sin embargo, esta metodología no fue útil como alternativa sintética para la obtención de **Q**, ya que se obtuvieron rendimientos muy bajos (5-44 %) comparados con la síntesis en solución (32-87 %). Cabe aclarar que el balance de masa promedio en las reacciones de FVP fue alrededor del 60 %. Además, en el proceso de FVP se generó una mezcla de productos entre los que se encontraban **Q'** y **FA**, los cuales no habían sido detectados en la síntesis en solución de quinolin-4-onas.⁴³

La detección del intermediario **FA** formado en la reacción de FVP, fue un dato clave para el estudio teórico del mecanismo que incluye a éste como precursor de la quinolona **Q'**. Además, es importante mencionar que dicha reacción es el primer ejemplo de descarboxilación de malonatos en fase gaseosa a temperaturas relativamente bajas, comparado con los procesos de pérdida de dióxido de carbono a partir de ácidos de Meldrum que ocurren alrededor de 600 °C.^{9,30,31}

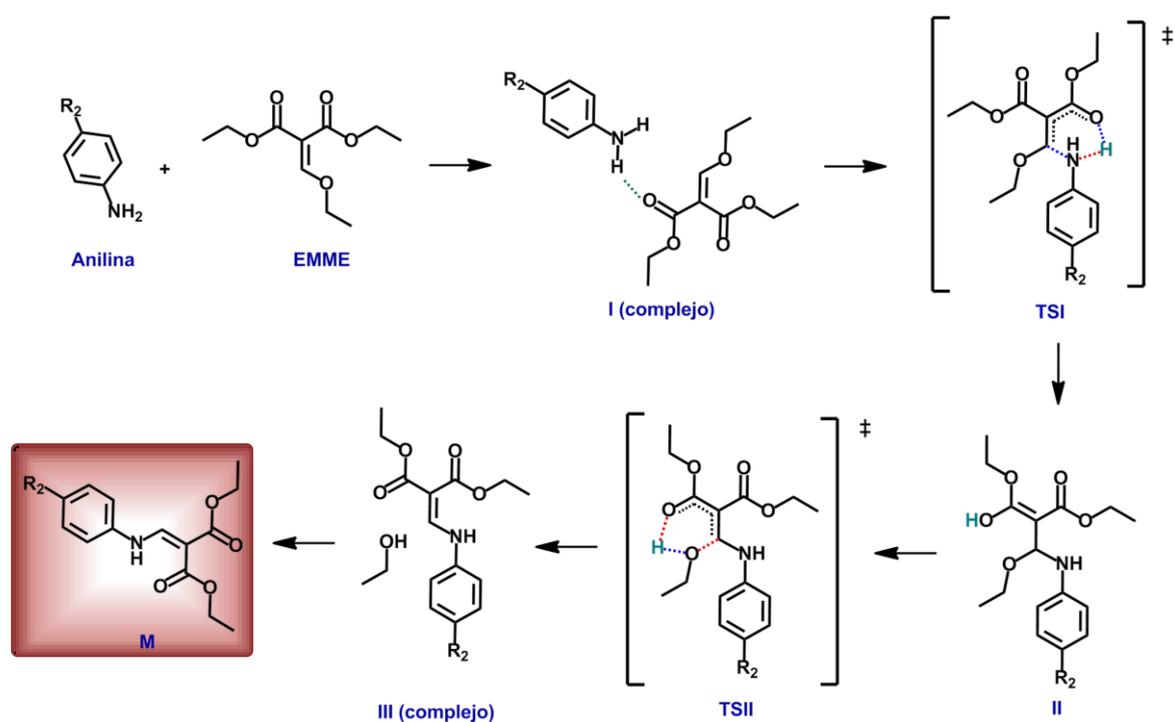
Finalmente, merece la pena destacar las diferencias encontradas con el trabajo reportado por Lengyel,¹² donde se realizó la síntesis en solución (MO) y en fase gaseosa (FVP) de derivados tiazolopirimidinona a partir de tiazolaminometilmalonatos. En dicho trabajo, solamente se observó descarboxilación cuando la reacción se llevó a cabo en solución con irradiación de MO; mientras que la reacción de FVP generó el derivado 3-carboetoxi en un 88 %. Por el contrario, la reacción de **M** en MO generó únicamente **Q**, mientras que la descarboxilación que dio lugar a **Q'** fue observada únicamente en el proceso de FVP.

2.4. Estudio teórico del mecanismo de formación de quinolin-4-onas en fase gaseosa

2.4.1. Etapa 1: formación de fenilamino-metilenmalonatos de dietilo

Para realizar los cálculos teóricos del mecanismo se seleccionaron como anilinas de partida aquellas con un sustituyente donador, un halógeno y un tomador de electrones ($R_2 = \text{OCH}_3, \text{Br}, \text{NO}_2$), con el fin de comparar la reactividad en función de los sustituyentes en las etapas más importantes del mecanismo.

La reacción de G-J estudiada se iniciaría con la formación de un complejo de encuentro entre ambos reactivos, estabilizado por un puente de hidrógeno ($\text{NH}\cdots\text{O}$) entre el grupo amino de la anilina y el carbonilo del EMME. Seguido a esto, se produciría la adición de la anilina al carbono vinílico del EMME, pasando por un estado de transición (TS, por sus siglas en inglés: *Transition State*) concertado de 23,5 kcal/mol, dando lugar al intermediario enol (II). Dicho intermediario puede fácilmente liberar una molécula de etanol, pasando nuevamente por un TS concertado con la transferencia de un átomo de hidrógeno (TSII, 24,2 kcal/mol), dando lugar al producto de la Etapa 1: fenilaminometilenmalonato de dietilo (M) (Esquema 2.18 y Figura 2.2.a).



Esquema 2.18. Etapa 1 del mecanismo propuesto para la reacción de G-J.

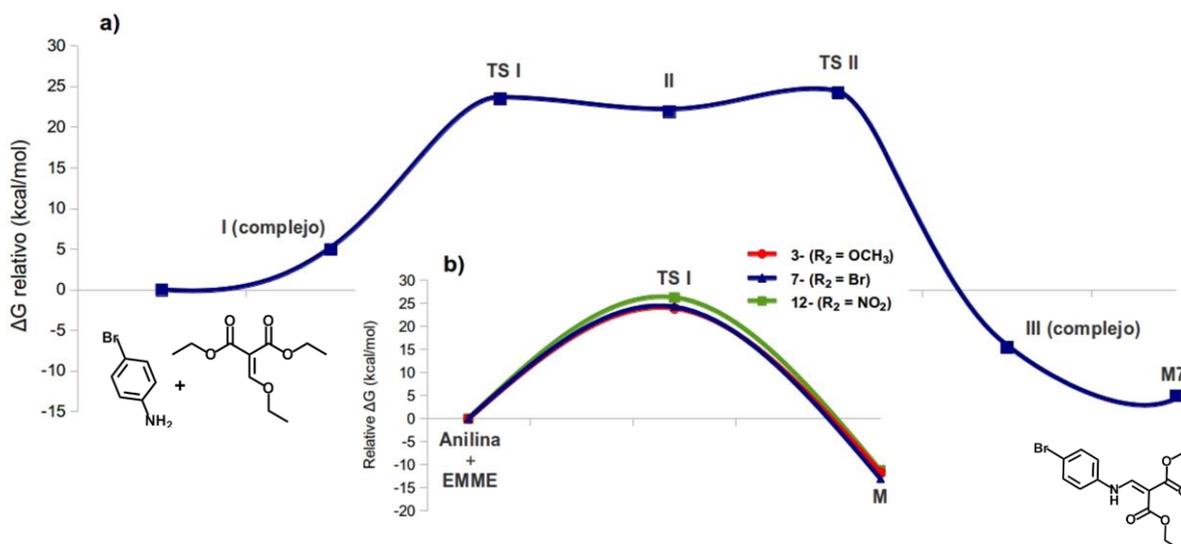


Figura 2.2. a) Perfil de energía libre de la Etapa 1 calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) para $R_2 = \text{Br}$. **b)** Comparación en función de los sustituyentes ($R_2 = \text{Br}$, OCH_3 y NO_2), calculado al mismo nivel de teoría. Incluye solo reactivos, **TSI** y productos (**M**).

Para los tres sustituyentes estudiados el perfil de energía libre fue muy similar ($\Delta\Delta G \sim 2$ kcal/mol), siendo levemente de menor energía para el caso de $R_2 = \text{OCH}_3$ (Figura 2.2.b), lo cual resulta razonable ya que se trata de un ataque nucleofílico de la anilina al EMME, siendo los grupos donores de electrones los que aumentan la nucleofilicidad de la amina.

2.4.2. Etapa 2: formación de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas y quinolin-4-onas

Transcurrida la formación de **M** (Etapa 1), éste puede interconvertirse en diferentes conforméromos (Figura 2.3) superando barreras de activación de ~ 10 kcal/mol, superior

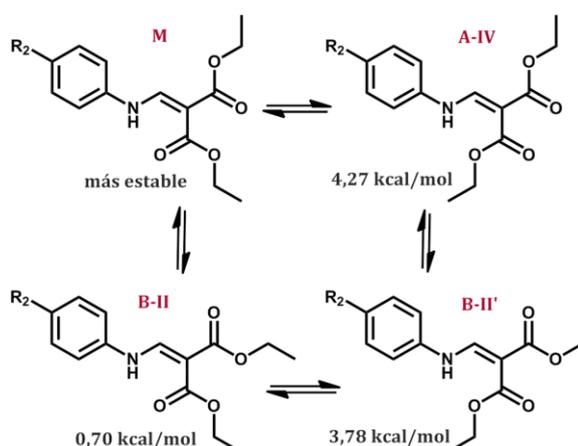


Figura 2.3.

Equilibrio conformacional de **M** y energías relativas al conforméromo más estable.

a la de los alcanos lineales debido a la presencia de enlaces conjugados. Dependiendo del conformero, se favorecería la eliminación de una molécula de etanol o de eteno, dando lugar a dos vías mecánicas diferentes que conducirían a la formación de las quinolin-4-onas observadas experimentalmente. De aquí en adelante se llamará *vía A* y *vía B*, a aquellas que conducen a la formación de **Q** y **Q'** respectivamente.

La *vía A* (Esquema 2.19) comenzaría con la estabilización de uno de los conformeros por puente de hidrógeno ($\text{NH}\cdots\text{O}$) intramolecular entre el grupo amino y el etoxi del éster (**A-IV**). Dicha conformación daría lugar a la pérdida de otra molécula de etanol, mediante un TS similar al encontrado en la Etapa 1 (**TSII**), generando un intermediario ceteno (**A-V**). La ceteno es un intermediario clave en el mecanismo de G-J y ha sido previamente reportada por varios grupos de investigación en la formación de quinolonas.^{11,44,45} La misma estaría en equilibrio con un intermediario cíclico de tipo azetina (**A-VI'**),^{45,46,47} el cual podría abrirse generando otro conformero del intermediario ceteno (**A-VI**) mediante un TS que es 2,63 kcal/mol más bajo en energía que el **TS-A-V** correspondiente a la rotación de la ceteno **A-V** (Figura 2.4 y Esquema 2.19).

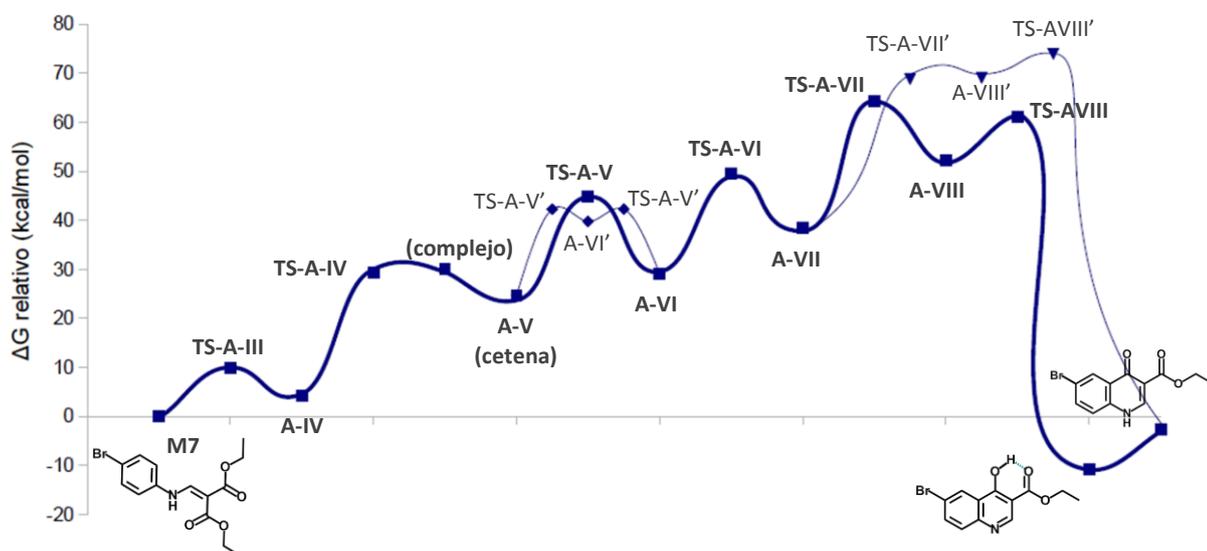
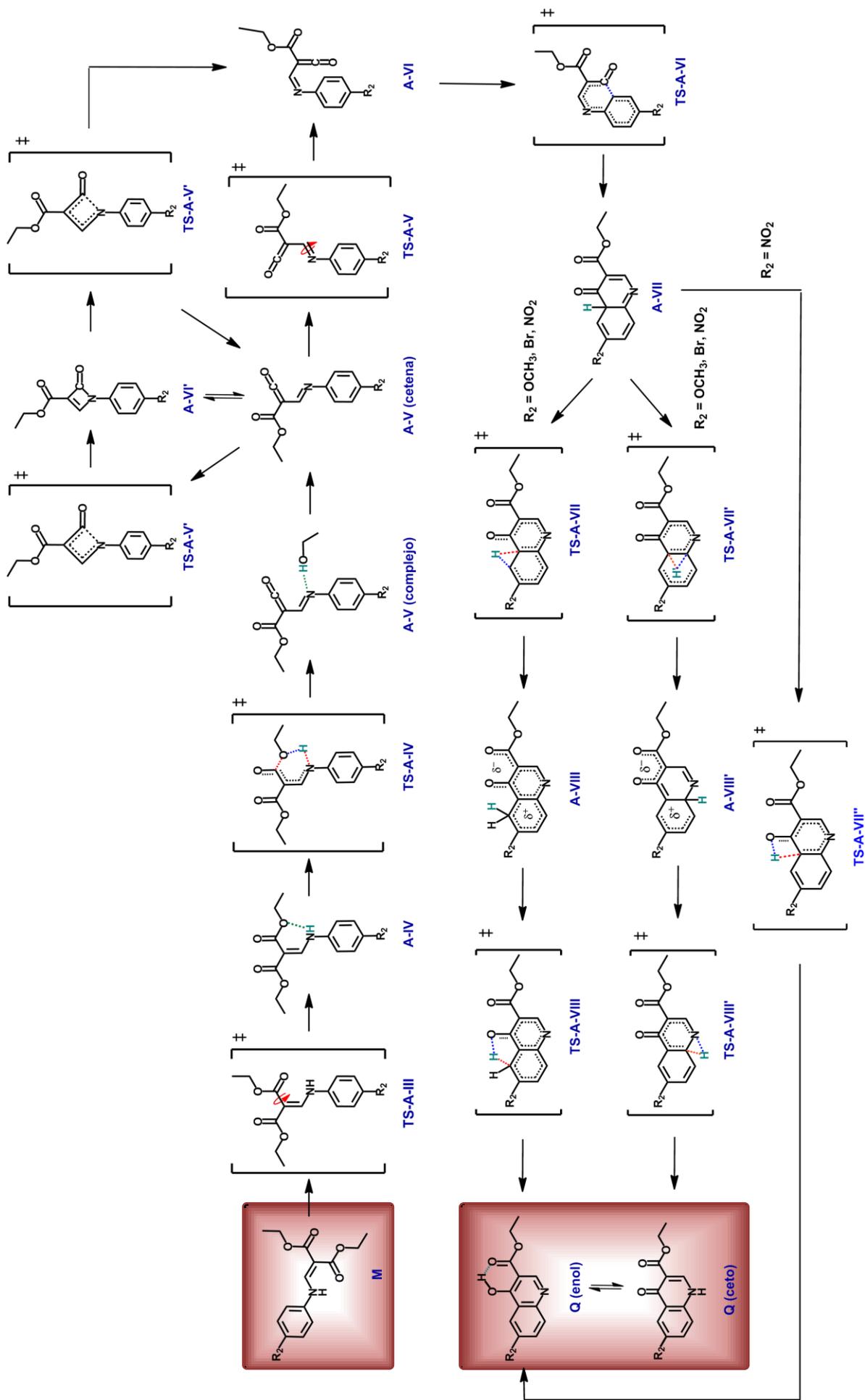


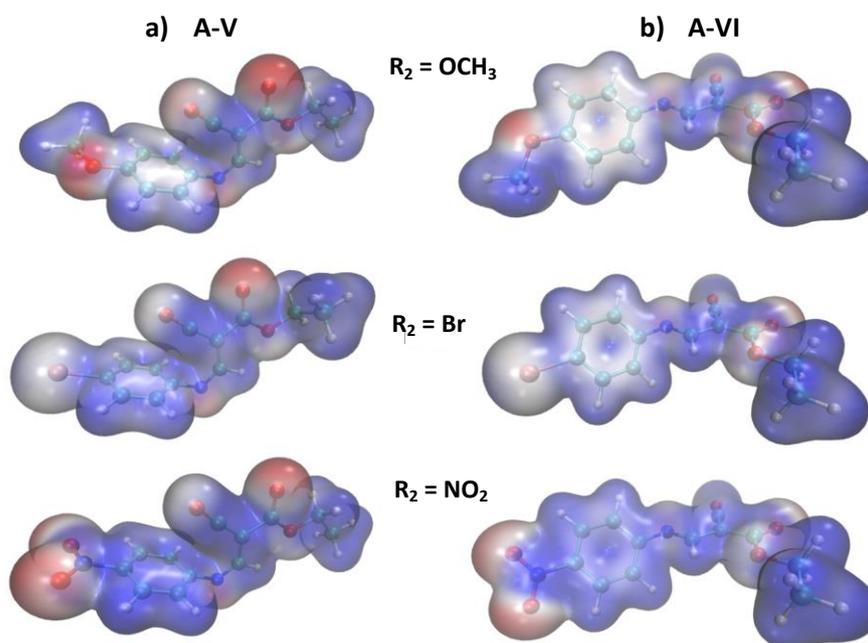
Figura 2.4. Perfil de energía libre de la Etapa 2 (*vía A*) para **M7** ($R_2 = \text{Br}$), calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p).



Esquema 2.19. Etapa 2 (vía A) del mecanismo propuesto para la reacción de G-J.

Figura 2.5

Potencial electrostático calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) de los isómeros de cetena **a) A-V** y **b) A-VI** para $R_2 = \text{OCH}_3$, Br y NO_2 . Referencia de colores: rojo = valores negativos; azul = valores positivos.



Mediante el cálculo del potencial electrostático de **A-V** y **A-VI** (Figura 2.5) se demostró que el carbono de la cetena es electrofílico, por lo que podría ser atacado por el grupo amino dando lugar al intermediario azetina **A-VI'**, o bien, isomerizar a la cetena **A-VI**, la cual es propensa a ser atacada por el anillo fenilo, dando lugar al intermediario **A-VII**.

El efecto electrónico de los sustituyentes comenzó a ser evidente en los **TS-A-V** y **TS-A-VI** (Figura 2.6). La riqueza de densidad electrónica (π) en el enlace imino ($\text{N}=\text{C}$) para $R_2 = \text{OCH}_3$ (Figura 2.5.a) incrementaría la barrera de rotación del **TS-A-V** debido al mayor carácter de doble enlace en $\text{N}=\text{C}$; mientras que para $R_2 = \text{NO}_2$ la barrera fue menor, ya que el efecto tomador de electrones de este grupo dejaría a $\text{N}=\text{C}$ con mayor carácter de simple enlace. Por lo tanto, la barrera energética para la isomerización de **A-V** hacia **A-VI** presentó el siguiente orden: $R_2 = \text{OCH}_3 > \text{Br} > \text{NO}_2$ (Figura 2.6). Por el contrario, la mayor densidad electrónica en el anillo fenilo de la cetena rotada **A-VI** (Figura 2.5.b) para $R_2 = \text{OCH}_3$ favorecería el ataque electrofílico de la cetena al anillo aromático (**TS-A-VI**) conduciendo a la formación de **A-VII**; por consiguiente, el orden de reactividad para la transformación de **A-VI** a **A-VII** fue: $R_2 = \text{NO}_2 < \text{Br} < \text{OCH}_3$ (Figura 2.6).

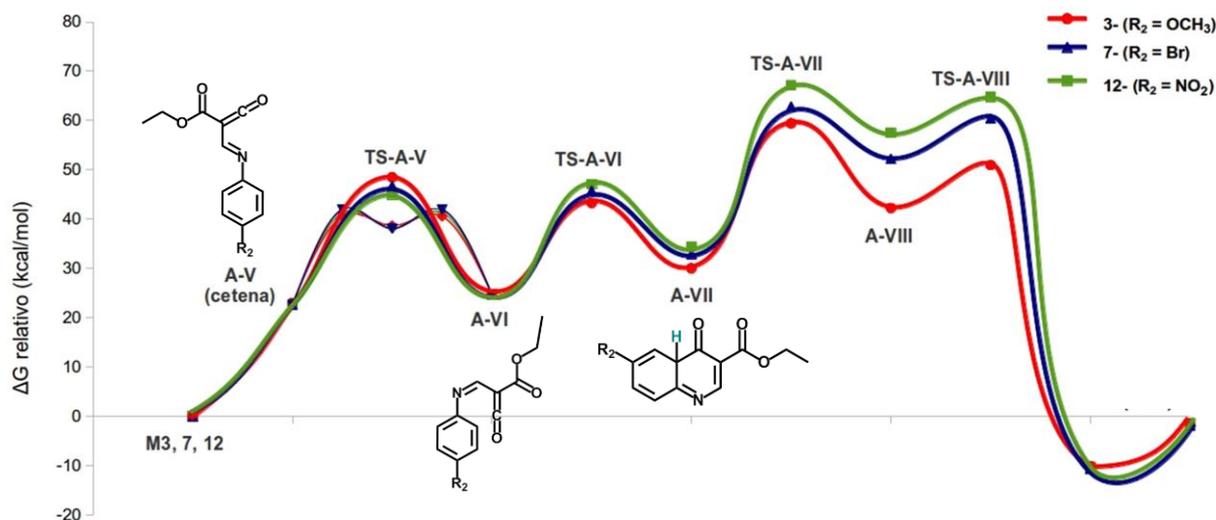


Figura 2.6. Comparación del perfil de energía libre de la *vía A* en función de los sustituyentes de **M** ($R_2 = \text{OCH}_3, \text{Br}, \text{NO}_2$), calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p).

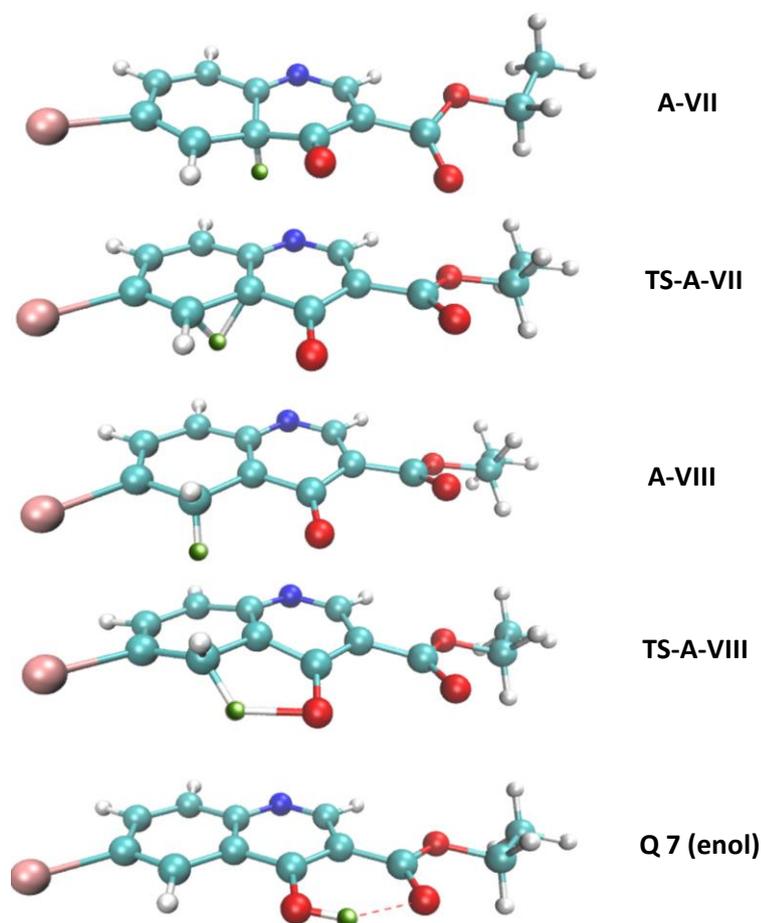
Cabe destacar que **TS-A-VI** sería posiblemente quien controle la velocidad de la reacción cuando la misma se realiza en solvente ya que, una vez formado **A-VII**, éste tautomerizaría fácilmente a la forma ceto o enol de la quinolona (**Q**) mediante procesos bimoleculares. Sin embargo, en condiciones de FVP, la única alternativa posible para la tautomerización sería mediante transferencia de hidrógeno intramolecular.

El proceso de tautomerización en fase gaseosa tendría lugar mediante dos migraciones de hidrógeno [1,2] y [1,4] sucesivamente para dar el tautómero enol (**TS-A-VII** y **TS-A-VIII**) y dos migraciones [1,2] para dar el tautómero ceto (**TS-A-VII'** y **TS-A-VIII'**), siendo la primer alternativa la de más baja energía. Esto puede deberse a que la migración [1,2] involucra un TS cíclico tensionado de tres miembros, mientras que la migración [1,4] involucra un TS de cinco miembros (Esquema 2.19, Figuras 2.4 y 2.7). De hecho, puede observarse en el perfil de energía (Figura 2.4) que el **TS-A-VII** es de mayor energía que el **TS-A-VIII** por el motivo antes mencionado.

La transferencia de hidrógeno [1,3], vía directa desde el carbono hacia el oxígeno para dar **Q enol**, fue encontrada solo para el caso de $R_2 = \text{NO}_2$. Sin embargo, esta posibilidad fue el camino de mayor energía comparado con las alternativas planteadas anteriormente (Figura 2.8). El hecho

Figura 2.7

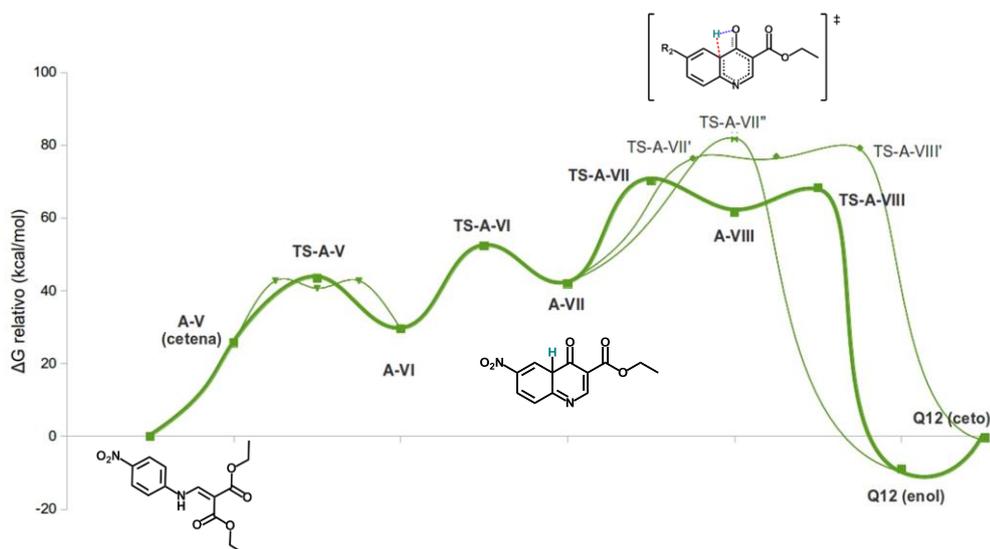
Estructuras de los puntos estacionarios para la secuencia de migraciones de hidrógeno de más baja energía desde **A-VII** hasta **Q enol** para (R = Br). (El H involucrado en las transposiciones está coloreado en verde. Se omite el TS de la rotación de OH para la formación del puente de hidrógeno).



que las transposiciones térmicas de hidrógeno [1,3] se den con mucha dificultad se debe a que si las mismas se producen en modo *suprafacial* son permitidas por geometría pero prohibidas por simetría de los orbitales frontera, mientras que si la migración fuese en modo *antarafacial*, ésta sería prohibida por geometría y permitida por simetría de orbital (Figura 2.9).

Figura 2.8.

Perfil de energía libre de la Etapa 2 (*vía A*) para **M12** ($R_2 = \text{NO}_2$), calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p)



En los **TS-A-VII** y **TS-A-VIII** se observó nuevamente un marcado efecto de los sustituyentes, siendo la barrera de activación para estas transiciones: $R_2 = \text{OCH}_3 < \text{Br} < \text{NO}_2$ (Figura 2.6). Analizando el potencial electrostático del intermediario **A-VII** puede demostrarse que el hidrógeno involucrado en los TS posee una densidad de carga positiva (Figura 2.10). Considerando que este protón realizaría primero una migración [1,2] hacia el carbono adyacente, es evidente que el aumento de la densidad electrónica en el anillo aromático favorecería esta transposición, mientras que la misma se vería desfavorecida para sustituyentes tomadores de electrones, los cuales generan en el anillo aromático una densidad de carga positiva. Este mismo efecto puede ser el motivo por el cual la transposición [1,3] fue observada solamente en el caso del $R_2 = \text{NO}_2$.

De acuerdo a las Figuras 2.4 y 2.6, podría proponerse a **TS-A-VII** como el paso determinante de la velocidad en fase gaseosa, ya que fue el TS de mayor energía en la reacción estudiada (64,3 kcal/mol respecto de reactivos para $R_2 = \text{Br}$). Sin embargo, en este caso bajo estudio, podrían aplicarse los conceptos introducidos por Kozuch y colaboradores,⁴⁸ quienes propusieron **estados determinantes de la velocidad**, los cuales comprenden el TS e intermediario que ejercen mayor efecto sobre la velocidad de reacción. Incluso esto da lugar a la definición de una **zona determinante de la velocidad**, la cual puede incluir más de dos estados consecutivos, es decir, todos los pasos que están

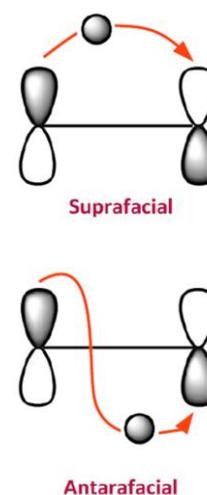


Figura 2.9.

Migración de hidrógeno [1,3] en modo *supra* y *antarafacial*.

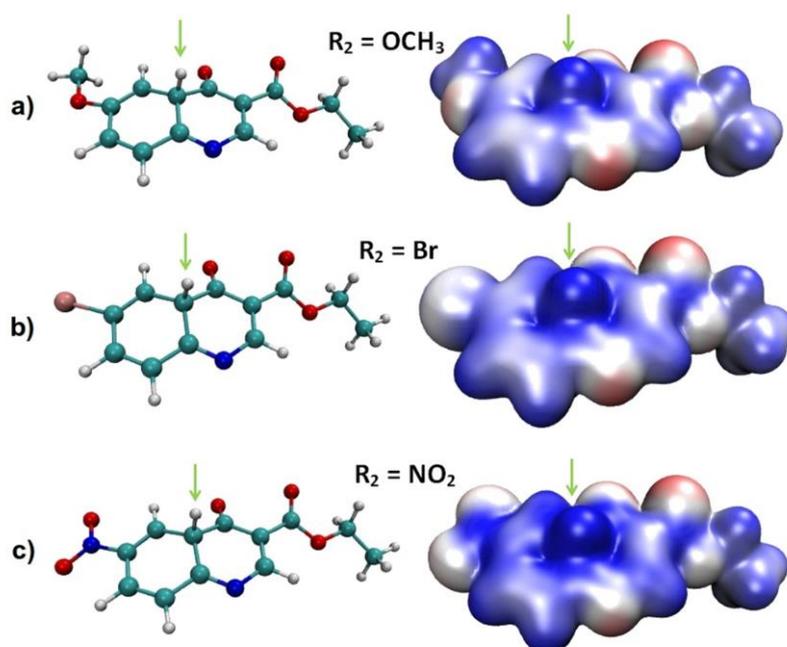


Figura 2.10

Estructuras y potencial electrostático del intermediario **A-VII**, calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) para: **a)** $R_2 = \text{OCH}_3$, **b)** $R_2 = \text{Br}$ y **c)** $R_2 = \text{NO}_2$. La flecha verde indica el protón involucrado en el TS.

Referencia de colores: rojo = valores negativos azul = valores positivos.

comprendidos entre los estados determinantes.⁴⁸ Por lo tanto, en este marco se propone para la reacción de G-J estudiada, que la zona determinante de la velocidad en la formación de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas sería aquella comprendida entre el intermediario **A-VII** y el producto final. Esta zona incluye los dos TS de mayor energía, siendo el último un paso irreversible, y además son los TS en los cuales se observó un marcado efecto de los sustituyentes. Es decir que, la velocidad de esta reacción en fase gaseosa estaría controlada por las transposiciones de protón a través de procesos unimoleculares, los únicos posibles en FVP.

Cabe destacar que varios grupos de investigación han reportado intermediarios del tipo **A-VI** y **A-VII**, en particular en reacciones de pirólisis de ácidos de Meldrum.^{11,31} Sin embargo, hasta el momento no se han reportado estudios detallados acerca del proceso de transferencia de protón intramolecular descrito en la última parte de la *vía A*. De hecho, los grupos que han realizado cálculos teóricos de reacciones de electrociclización 6π , incluyendo intermediarios del tipo **A-VII**, no han encontrado los TS correspondientes a estas transposiciones de protón.^{10,45} Consecuentemente, al ser éstas transposiciones de alta energía y poco estudiadas, se efectuaron cálculos teóricos de mayor precisión, a nivel *Coupled Cluster* (CCSD(T)), que permitieran confirmar el mecanismo propuesto para la formación de **Q**. En la Figura 2.11 se muestra la comparación

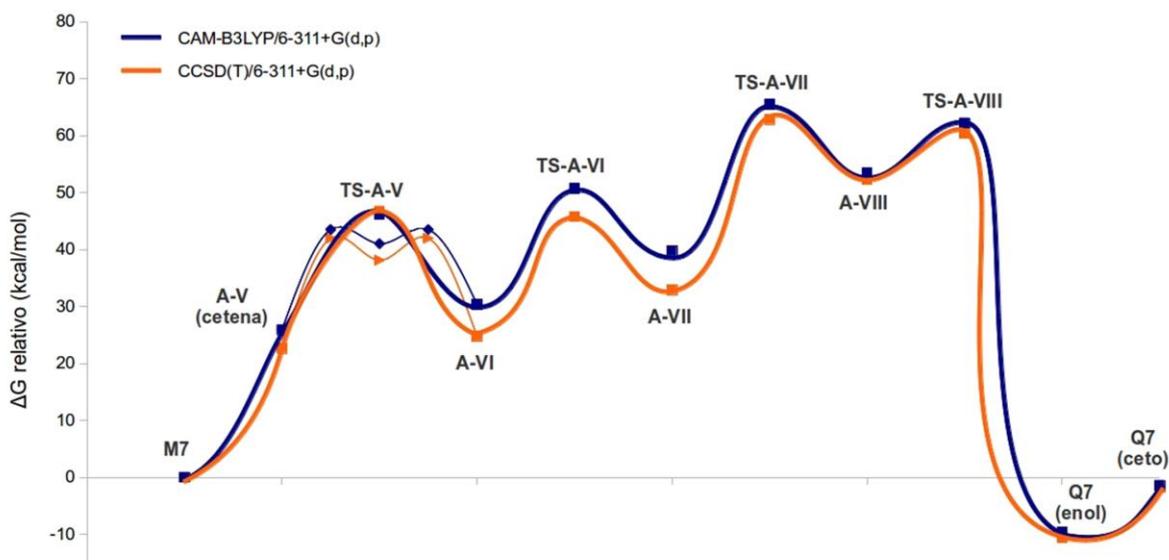


Figura 2.11. Comparación del perfil de energía libre de la Etapa 2 (*vía A*) para **M7** (R₂ = Br) a diferentes niveles de teoría: CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) vs. CCSD(T)/6-311G(d,p).

de los perfiles de energía de reacción calculados a diferentes niveles de teoría. Se observa que los valores de energías calculados con B3LYP/6-311+G(d,p) fueron muy similares a los calculados con CCSD(T)/6-311G(d,p), particularmente en los TS involucrados en la zona determinante de la velocidad.

Como se mencionó en la Sección 2.3.2, la FVP de fenilaminometilenmalonatos de dietilo condujo a la formación de una mezcla de quinolin-4-onas. Una vez comprendida en detalle la *vía A*, se procedió a estudiar el mecanismo que explicaría la formación de **Q'** (*vía B*).

Debido a las altas temperaturas utilizadas en la reacción de FVP, sería posible alcanzar un TS de mayor energía que la liberación del etanol, correspondiente a la liberación de eteno a partir de **M** (**TS-B-II** o **TS-B-III'**), aproximadamente a 62 kcal/mol (Esquema 2.20 y Figura 2.12). Una vez liberada la molécula de eteno, el intermediario formado (**B-III**) puede perder etanol y CO₂ en dos pasos consecutivos (**TS-B-VI''** y **B-VI''**, color verde Figura 2.12) o en un paso concertado (**TS-B-VI'**, color rojo Figura 2.12). Otra posibilidad podría ser la liberación de CO₂ a partir de **B-IV** para dar el cumuleno **B-V**, seguido de la formación de fenilaminoacrilato (**FA**), el cual puede perder etanol para dar el intermediario iminocetena (**TS-B-VI**, color celeste Figura 2.12). Cualquiera de estas vías, a pesar de tener altas barreras de activación, continuaban siendo levemente inferiores al TS de mayor energía de la *vía A* (**TS-A-VII**).

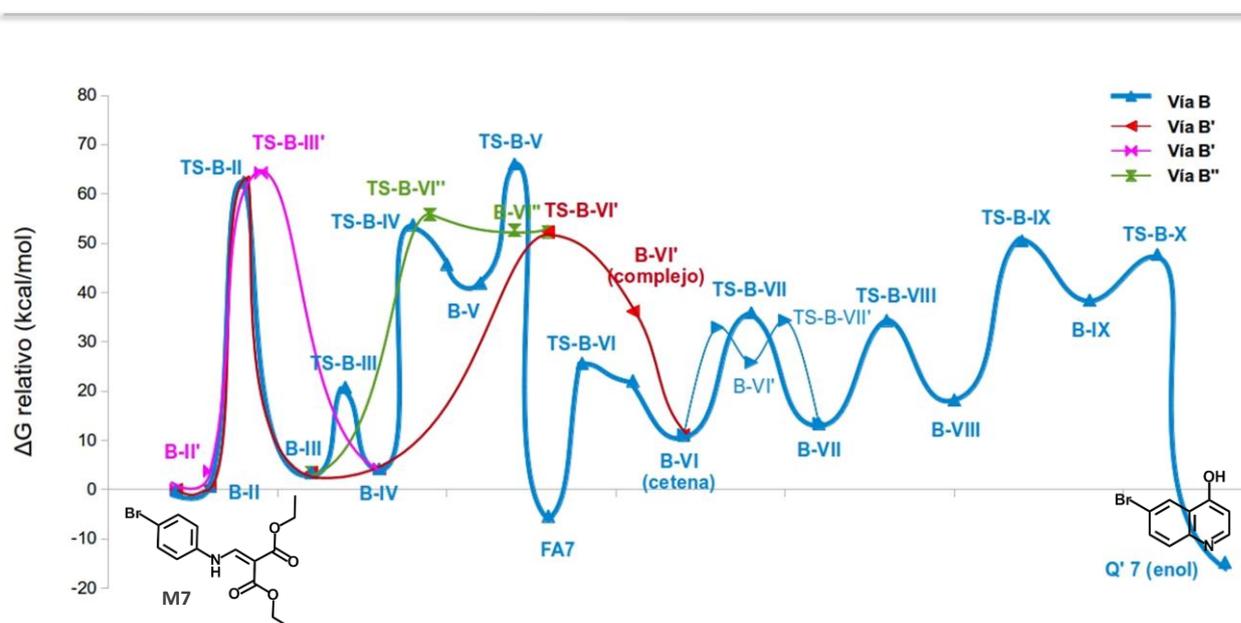


Figura 2.12. Perfil de energía libre de la Etapa 2 (*vía B*) para **M7** (R₂ = Br), calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p).

El hecho de haber detectado el intermediario **FA** en los experimentos de FVP, además de considerar que éste fue el intermediario termodinámicamente más estable (-5,33 kcal/mol, Figura 2.12), permitió el estudio de la *vía B* considerando la pérdida del grupo carboetoxi a partir de **M**, en lugar de pensar en un proceso de descarboxilación una vez formada la quinolona **Q**. Asimismo, cabe destacar que, la eliminación de grupos carboetoxi en fase gaseosa suelen ocurrir a temperaturas muy altas (600-800 °C) en la mayoría de los compuestos orgánicos.¹³

Finalmente, el TS que daría origen al intermediario **FA** fue el de mayor energía (**TS-B-V** = 66,1 kcal/mol) a lo largo de esta vía, e incluso, levemente mayor que el TS más alto de la *vía A* (**TS-A-VII**). Este hecho probablemente se asocie a la migración de protón [1,3] en el intermediario cumuleno para formar el fenilaminoacrilato. Por consiguiente, y debido a la irreversibilidad de este paso, se propone que la formación de dicho intermediario (**FA**) podría ser el estado determinante de la velocidad en la *vía B*. De aquí en adelante, el mecanismo de formación de **Q'** continuaría en un modo análogo al calculado para la *vía A*; esto es, la formación de un intermediario iminocetena (**B-VI**), cierre de anillo y transposiciones sucesivas de protón (Figura 2.12, Esquema 20).

2.4.3. Análisis comparativo de ambas vías de reacción de la Etapa 2

La diferencia entre la *vía A* y *vía B* radica en las moléculas que se desprenden inicialmente. Si la misma es solamente una molécula de etanol, continuaría hacia la formación de **Q**; mientras que, si se elimina eteno seguido de la pérdida de CO₂ y etanol (o viceversa), sería **Q'** el producto final. En ambos casos, la pérdida de moléculas pequeñas da lugar a un intermediario ceteno (**A-V** o **B-VI** dependiendo la vía), el cual sufriría un ataque nucleofílico del anillo fenilo, seguido de las transposiciones de protón mencionadas en la sección anterior, para dar lugar al producto quinolin-4-ona (Figura 2.13).

Finalmente, cabe destacar la correlación encontrada entre los estudios teóricos y experimentales. El proceso que conduce a la formación de **Q** fue competitivo con el que genera la quinolona descarboxilada **Q'**. Las cantidades relativas de ambos productos en el pirolizado pueden ser racionalizadas por la estabilidad de los TS involucrados en

las diferentes vías de reacción. La prevalencia en la formación de un producto u otro fue evidente cuando las barreras de activación fueron comparadas entre los diferentes sustratos.

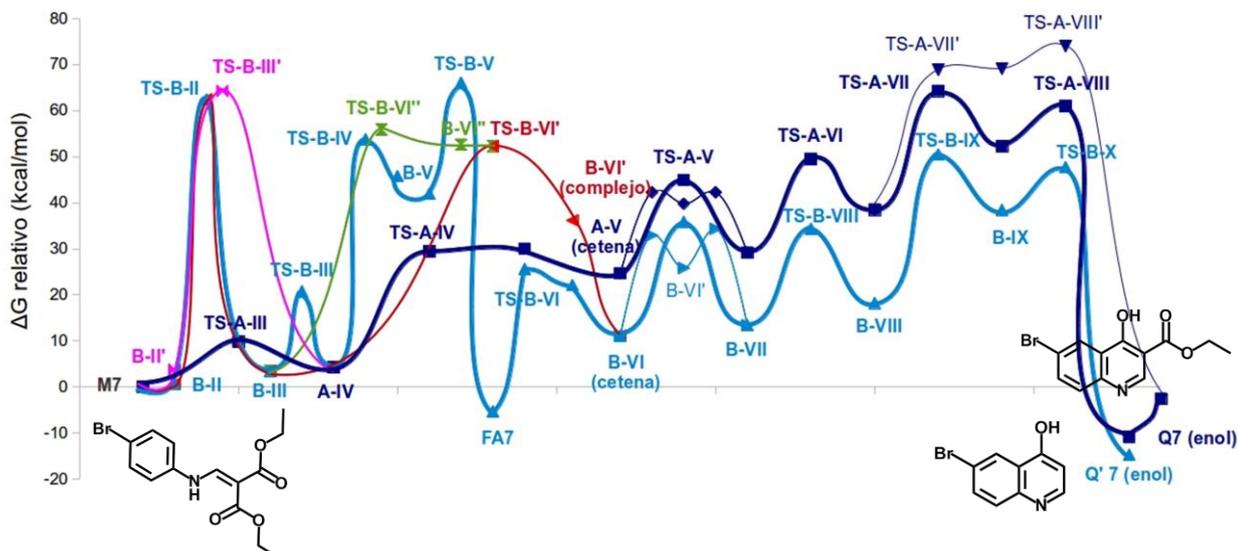


Figura 2.13. Comparación entre los perfiles de energía libre de la *vía A* (azul) y *vía B* (celeste) calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p).

A continuación se muestra, a modo de resumen, el perfil de energía completo de la reacción de G-J estudiada junto con los reactivos, intermediario **FA** y productos (**M**, **Q** y **Q'**) encontrados en la reacción de FVP (Figura 2.14). La Etapa 1 hasta la formación de **M** se representa en color azul, al igual que la *vía A* de la Etapa 2 que conduce a la formación de **Q**. Mientras que la *vía B* que da como producto la quinolona descarboxilada (**Q'**) se representa en color celeste y sus vías alternativas en magenta, rojo y verde.

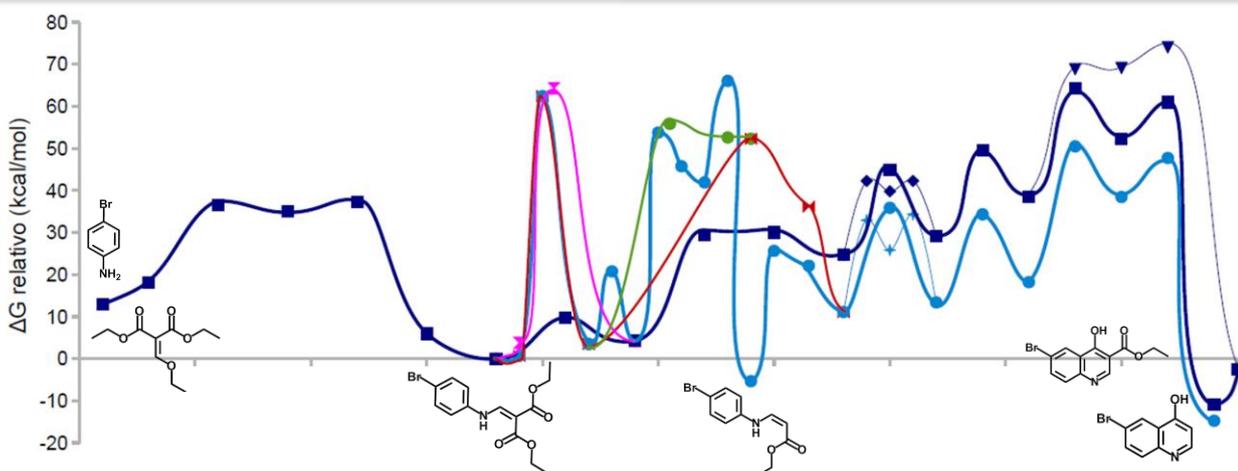


Figura 2.14. Perfil de energía libre completo. Etapa 1 junto con Etapa 2 *vía A* (azul) y Etapa 2 *vía B* (celeste, magenta, rojo y verde) calculado a nivel CAM-B3LYP/6-311+G(d,p).

Los reactivos empleados fueron de grado comercial y se utilizaron sin previa purificación. En tanto los solventes usados se destilaron previamente. Las cromatografías en capa delgada se realizaron con sílica-gel Merck (60 DGF254).

Los espectros de RMN ^1H fueron realizados en un equipo Bruker Advance II FT-400 MHz (^1H a 400,16 MHz) utilizando CDCl_3 para la fracción soluble y $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ para la fracción insoluble. Los corrimientos químicos (δ) se encuentran informados en partes por millón (ppm) tomando como referencia la señal residual de los solventes utilizados y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

Los espectros de masas se obtuvieron por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) con un equipo Shimadzu GCMS QP-5050 con fuente de ionización electrónica de 70 eV y equipado con columna capilar de VF-5ms (5 % fenil 95% dimetilpolimetilsiloxano) de 30 m de largo x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 μm de espesor de film. Los cromatogramas se obtuvieron utilizando helio como eluyente a un flujo de 1,1 mL/min con rampa de calentamiento de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ desde 120 $^\circ\text{C}$ hasta 280 $^\circ\text{C}$. Los picos de fragmentación se expresaron en porcentajes de abundancia relativa.

La caracterización de los compuestos sintetizados se encuentran en la sección ANEXO (páginas XVIII-XIX y XXV).

2.5.1. Flash Vacuum Pyrolysis (FVP)

Antes de comenzar con las reacciones de pirólisis de los fenilaminometilenmalonatos de dietilo, se realizó una prueba de sublimación. La misma consistió en colocar la muestra dentro de un equipo usado para tal fin (Figura 2.15), el cual estaba conectado a una bomba de vacío, simulando las condiciones de FVP. Al calentarse el baño de glicerina, la muestra comienza a fundir y luego se observa la condensación de la misma sobre el dedo frío (proceso de sublimación). Cuando comienza este fenómeno se toma la temperatura marcada por el termómetro.

Las reacciones térmicas de FVP se realizaron en un reactor tubular de cuarzo utilizando un horno Thermolyne 21100 (Figura 2.1). Los experimentos se efectuaron utilizando nitrógeno 5.0 (seco y libre de oxígeno) como gas transportador.

Previo a las reacciones de FVP, se efectuó un depósito de carbón sobre la superficie del reactor para evitar cualquier tipo de catálisis por la superficie del vidrio. Para ello, se

2.5.

Metodología

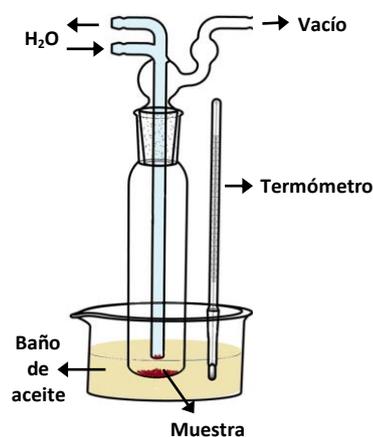


Figura 2.15.

Equipo de sublimación.

realizó una reacción de pirólisis de bromuro de alilo a 550 °C, y luego de finalizada la reacción se logró visualizar un depósito carbonoso sobre las paredes del reactor.

Las reacciones de pirólisis de fenilamino-metilenmalonato de dietilo se realizaron en un rango de temperatura de 250-500 °C, siendo 330 °C la temperatura óptima. El vacío del sistema se mantuvo a $\sim 10^{-2}$ Torr, el caudal de gas transportador (N_2) fue de 0,10-0,11 mL/s, la cantidad de muestra pirolizada en cada experimento fue de ~ 20 mg (0,051-0,076 mmol) y el tiempo de reacción de 1h. Los productos se recolectaron en una trampa en forma de "U" sumergida en nitrógeno líquido, los cuales fueron extraídos con acetona. Posteriormente mediante una filtración al vacío se separaron los productos sólidos, o insolubles en acetona, de los productos solubles en este solvente para su ulterior análisis y cuantificación relativa por RMN 1H .

2.5.2. Métodos computacionales

Los cálculos de la coordenada de reacción, tanto de la *vía A* como la *vía B*, se llevaron a cabo utilizando el paquete de programas Gaussian 09⁴⁹ a nivel DFT.

Todos los puntos estacionarios más relevantes del mecanismo (*vía A* y *B* para $R_2 = Br$, y solo *vía A* para $R_2 = OCH_3$ y NO_2) también fueron calculados utilizando el *software* PQS 4.0,⁵⁰ implementando la teoría de *Coupled Clusters*,⁵¹ a nivel CCSD(T),⁵² dentro de su módulo CORR,⁵³ utilizando un *cluster* de CPU de 192 GB de RAM.

Todas las estructuras de reactivos, TS, intermediarios y productos fueron optimizados en fase gaseosa a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p)⁴⁰ y caracterizados por medios de la diagonalización de la matriz Hessiana y posterior análisis de las frecuencias para obtener las correcciones térmicas y de punto cero para la energía electrónica, entalpía y energía libre de Gibbs. Luego, las energías a nivel CCSD(T)/6-311G(d,p) fueron computadas con las estructuras ya optimizadas.

En algunos casos, para confirmar la conexión entre los TS calculados y los mínimos designados, fue necesaria la implementación de simulaciones de coordenadas intrínsecas de reacción (IRC, *Intrinsic Reaction Coordinates*).

Para la visualización de resultados y generación de imágenes se utilizaron los programas Gabedit 2.4.7⁵⁴ y VMD 1.8.9.⁵⁵

Se llevó a cabo la reacción de G-J partiendo de anilinas *para* sustituidas y EMME, combinando irradiación de MO, para la formación de fenilaminometilmalonatos de dietilo y, FVP para estudiar el proceso de ciclización de estos últimos hacia los núcleos de quinolin-4-onas. Cabe destacar que si bien estos procesos se habían estudiado mediante técnicas de flujo,¹⁰⁻¹² es la primera vez que se realizaron en condiciones de FVP.

La reacciones en fase gaseosa condujeron a la formación de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (**Q**) y del producto de descarboxilación (**Q'**) por vías competitivas, lo cual no había sido observado en la síntesis asistida por MO de **Q** (Capítulo 1).⁴³ Tal motivo llevó a la realización de un estudio detallado del mecanismo de reacción que permitiera explicar la formación de ambos productos.

Mediante cálculos computacionales a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) y CCSD(T)/6-311G(d,p), se propusieron los mecanismos que conducirían tanto a la formación de **M** como a las quinolonas **Q** y **Q'** (*vía A* y *vía B* respectivamente).

Según el mecanismo propuesto, una vez formado **M**, éste podría perder una molécula de etanol, continuando así hacia la formación de **Q**; o bien, liberar eteno y CO₂ seguido de la pérdida de etanol dando el producto **Q'**. En ambos casos, la eliminación de moléculas pequeñas daría lugar a un intermediario iminocetena (**A-V** o **B-VI**), similar al descrito previamente en la FVP de ácidos de Meldrum.^{1,3,9} Dicha cetena podría ciclar hacia un intermediario tipo quinolona (**A-VII** o **B-VIII**), el cual posteriormente tautomerizaría al producto final mediante dos migraciones de hidrógeno consecutivas [1,2] y [1,4]. Sorprendentemente, los TS de mayor energía involucran las transposiciones de protón que podrían comprender la zona determinante de la velocidad de la reacción en fase gaseosa. Cabe destacar que estos procesos de alta energía de activación fueron mencionados en reacciones similares,^{10,45} aunque la caracterización de estos TS no ha sido reportada hasta el momento.

Se analizó el efecto de los sustituyentes sobre el anillo aromático en los pasos más importantes de la reacción, en particular, en la formación de la iminocetena y cierre de anillo.

Experimentalmente se determinó la presencia de un intermediario 3-(fenilamino)acrilato de etilo (**FA**), indicando que la descarboxilación proviene de **M** y no del derivado

2.6.

Conclusiones

ácido de **Q**, como se había descrito previamente en reacciones de termólisis en solución (250-300 °C)^{1,4,5} o en fase gaseosa (600-800 °C).¹³

2.7.

Referencias bibliográficas

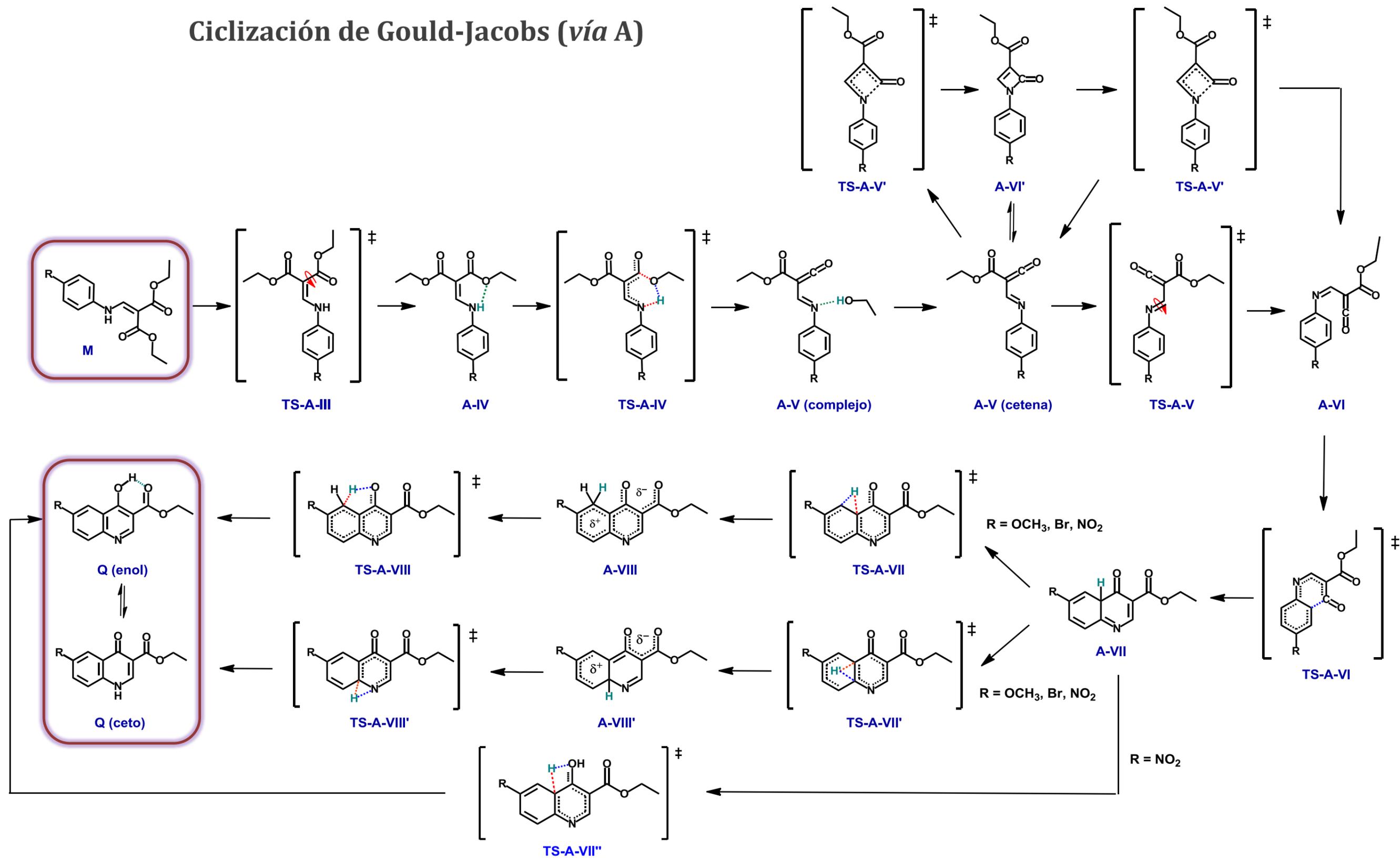
- (1) Li, J. J. *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry*, Corey E. J.; Wiley-Interscience: Hoboken, N.J, 2005.
- (2) Conrad, M.; Limpach, L. Synthesen von Chinolinderivaten Mittelst Acetessigester. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20* (1), 944–948.
- (3) Gould, R. G.; Jacobs, W. A. The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and 5,6-benzoquinolines. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2890–2895.
- (4) Reitsema, R. H. The Chemistry of 4-hydroxyquinolines. *Chem. Rev.* **1948**, *43* (1), 43–68.
- (5) Markees, D. G.; Schwab, L. S. The Synthesis and Some Reactions of *N*-alkyl-4-quinolone-3-carboxylic Acids. *Helv. Chim. Acta* **1972**, *55* (4), 1319–1326.
- (6) Bella, M.; Schultz, M.; Milata, V.; Koňariková, K.; Breza, M. Application of the Gould–Jacobs Reaction to 4-amino-2,1,3-benzoselenadiazole. *Tetrahedron* **2010**, *66* (41), 8169–8174.
- (7) Desai, N. D. The Gould-Jacob Type of Reaction for the Synthesis of Novel Pyrimidopyrrolopyrimidines: A Comparison of Classical Heating vs. Solvent Free Microwave Irradiation. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43*, 1343–1348.
- (8) Saloň, J.; Milata, V.; Prónayová, N.; Leško, J. Utilisation of 6-amino-2,3-dimethylquinoxaline for the Synthesis of Tricyclic Pyridoquinoxalines via Gould-Jacobs Reaction. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2001**, *66* (11), 1691–1697.
- (9) Briehl, H.; Lukosch, A.; Wentrup, C. Reactive Nitrogenous Molecules from Meldrum's Acid Derivatives, Pyrrole-2,3-diones, and Isoxazolones. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (15), 2772–2779.
- (10) Cantillo, D.; Sheibani, H.; Kappe, C. O. Flash Flow Pyrolysis: Mimicking Flash Vacuum Pyrolysis in a High-Temperature/High-Pressure Liquid-Phase Microreactor Environment. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (5), 2463–2473.
- (11) Lengyel, L.; Nagy, T. Z.; Sipos, G.; Jones, R.; Dormán, G.; Üрге, L.; Darvas, F. Highly Efficient Thermal Cyclization Reactions of Alkylidene Esters in Continuous Flow to Give Aromatic/heteroaromatic Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (7), 738–743.
- (12) Lengyel, L. C.; Sipos, G.; Sipócz, T.; Vágó, T.; Dormán, G.; Gerencsér, J.; Makara, G.; Darvas, F. Synthesis of Condensed Heterocycles by the Gould–Jacobs Reaction in a Novel Three-Mode Pyrolysis Reactor. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19* (3), 399–409.
- (13) Brown, R. F. C. *Pyrolytic Methods in Organic Chemistry: Application of Flow and Flash Vacuum Pyrolytic Techniques*, Wasserman, H.; Academic Press, Inc.: New York, 1980; Vol. 41.
- (14) Hurd, C. D. *The Pyrolysis of Carbon Compounds*; The Chemical Catalog Company, Inc.: Michigan. USA, 1929.

- (15) Vallée, Y. *Gas Phase Reactions in Organic Synthesis*; CRC Press: Amsterdam, Holanda, 1998.
- (16) Rademacher, P. "Fragmentations of Five-Membered Rings" *En Advances in Heterocyclic Chemistry*, Ed.: Katritzky, A.; Academic Press: New York, 1999; Vol. 72.
- (17) Karpf, M. Organic Synthesis at High Temperatures. Gas-Phase Flow Thermolysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25* (5), 414–430.
- (18) Duffy, E. F.; Foot, J. S.; McNab, H.; Milligan, A. A. An Empirical Study of the Effect of the Variables in a Flash Vacuum Pyrolysis (FVP) Experiment. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (18), 2677–2683.
- (19) Pérez, J. D.; Yranzo, G. I.; Ferraris, M. A.; Claramunt, R. M.; López, C.; Elguero, J. FVP of Bis- and tris-(pyrazol-1-yl)methane. A Radical Reaction. *Tetrahedron* **1988**, *44* (20), 6429–6434.
- (20) Hickson, C. L.; McNab, H. Furo[3,2-*b*]pyridine and Thieno[3,2-*b*]pyridine. *Synthesis* **1981**, *1981* (06), 464–465.
- (21) Campbell, S. E.; Comer, M. C.; Derbyshire, P. A.; Despinoy, X. L. M.; McNab, H.; Morrison, R.; Sommerville, C. C.; Thornley, C. Synthesis of Pyrrolizin-3-ones by Flash Vacuum Pyrolysis of pyrrol-2-yl-methylidene Meldrum's Acid Derivatives and 3-(pyrrol-2-yl)propenoic Esters. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1997**, No. 15, 2195–2202.
- (22) Lucero, P. L.; Peláez, W. J.; Riedl, Z.; Hajós, G.; Moyano, E. L.; Yranzo, G. I. Flash Vacuum Pyrolysis of Azolylacroleins and Azolylbutadienes. *Tetrahedron* **2012**, *68* (4), 1299–1305.
- (23) McNab, H. Synthetic Applications of Flash Vacuum Pyrolysis. *Contemp. Org. Synth.* **1996**, *3* (5), 373–396.
- (24) Frimpong-Manso, S.; Nagy, K.; Stájer, G.; Bernáth, G.; Sohár, P. Preparation of Uracil by Cycloreversion. Structure of Cycloalkane/ene- and Norbornane/ene-Fused Dihydrouracils. *J. Heterocycl. Chem.* **1992**, *29* (1), 221–224.
- (25) Stajer, G.; Csende, F.; Fulop, F. The Retro Diels-Alder Reaction as a Valuable Tool for The Synthesis of Heterocycles. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7* (14), 1423–1432.
- (26) Zhou, A.; Segi, M.; Nakajima, T. The Reaction of Selenoaldehydes with 2-methoxyfuran Using Their Generation by Retro Diels–Alder Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (6), 1179–1182.
- (27) Bloch, R.; Bortolussi, M.; Girard, C.; Seck, M. Stereocontrolled Reactions Induced by a Thermolabile Group. Synthesis of Optically Active 1,3-Diols. *Tetrahedron* **1992**, *48* (3), 453–462.
- (28) Banert, K.; Hagedorn, M.; Müller, A. Synthesis of New Vinyl Thiocyanates by [3,3] Sigmatropic Rearrangement of Isothiocyanates. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001* (6), 1089–1103.
- (29) Peláez, W. J.; Yranzo, G. I.; Gróf, C.; Riedl, Z.; Hajós, G. Unexpected Valence Bond Isomerization of [1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]benzotriazines under Flash Vacuum Pyrolytic (fvp) Conditions. *Tetrahedron* **2005**, *61* (31), 7489–7498.

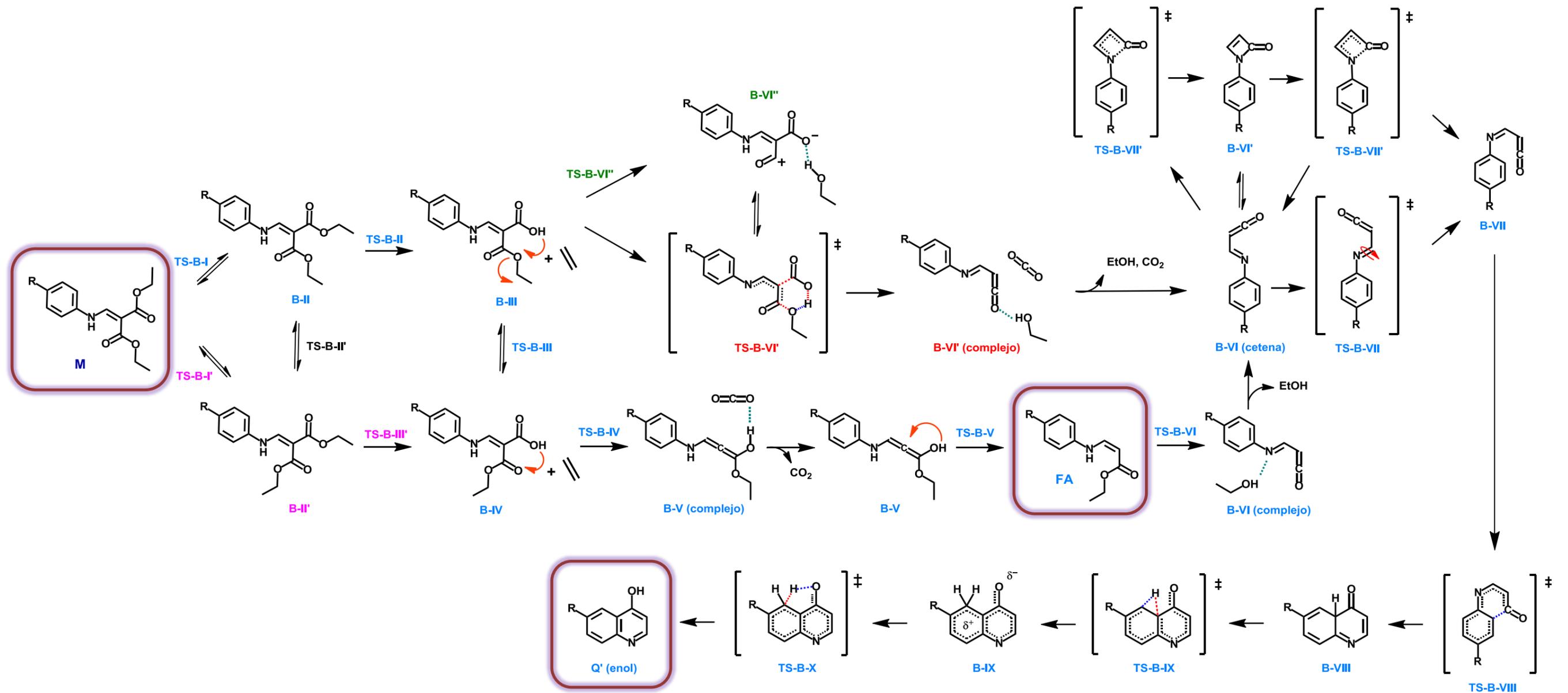
- (30) Hunter, G. A.; McNab, H. Gas-Phase Synthesis of N-Alkenyl-3-Hydroxypyrrroles by Sequential Collapse of Two Dipolar Intermediates. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, No. 9, 794.
- (31) Gaber, A. E.-A. M.; McNab, H. Synthetic Applications of the Pyrolysis of Meldrum's Acid Derivatives. *Synthesis* **2001**, *14*, 2059–2074.
- (32) Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*, 2 edition.; Wiley: Chichester, England ; Hoboken, NJ, 2007.
- (33) Orio, M.; Pantazis, D. A.; Neese, F. Density Functional Theory. *Photosynth. Res.* **2009**, *102* (2-3), 443–453.
- (34) Becke, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38* (6), 3098–3100.
- (35) Perdew, J. P.; Burke, K.; Wang, Y. Generalized Gradient Approximation for the Exchange-Correlation Hole of a Many-Electron System. *Phys. Rev. B* **1996**, *54* (23), 16533–16539.
- (36) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789.
- (37) Siegbahn, P. E. M. The Performance of Hybrid DFT for Mechanisms Involving Transition Metal Complexes in Enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11* (6), 695–701.
- (38) Parthiban, S.; de Oliveira, G.; Martin, J. M. L. Benchmark Ab Initio Energy Profiles for the Gas-Phase SN2 Reactions $Y^- + CH_3X \rightarrow CH_3Y + X^-$ ($X, Y = F, Cl, Br$). Validation of Hybrid DFT Methods. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105* (5), 895–904.
- (39) Tawada, Y.; Tsuneda, T.; Yanagisawa, S.; Yanai, T.; Hirao, K. A Long-Range-Corrected Time-Dependent Density Functional Theory. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120* (18), 8425–8433.
- (40) Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C. A New Hybrid Exchange–correlation Functional Using the Coulomb-Attenuating Method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *393* (1-3), 51–57.
- (41) Gauss, J. Coupled-Cluster Theory. In *Encyclopedia of Computational Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- (42) Bartlett, R. J.; Musiał, M. Coupled-Cluster Theory in Quantum Chemistry. *Rev. Mod. Phys.* **2007**, *79* (1), 291–352.
- (43) Malvacio, I.; Vera, D. M. A.; Moyano, E. L. Microwave Assisted Synthesis of Ethyl-quinolon-4-one-3-carboxylates and Hydrolysis to Quinolon-4-one-3-carboxylic Acids. *Curr. Microw. Chem.* **2014**, *1*, 52–58.
- (44) Stadlbauer, W.; Badawey, E.-S.; Hojas, G.; Roschger, P.; Kappe, T. Malonates in Cyclocondensation Reactions. *Molecules* **2001**, *6* (4), 338–352.
- (45) George, L.; Netsch, K.-P.; Penn, G.; Kollenz, G.; Wentrup, C. Oxoketene–oxoketene, Imidoylketene–imidoylketene and Oxoketenimine–imidoylketene Rearrangements. 1,3-Shifts of Phenyl Groups. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (3), 558.
- (46) Ding, W.-J.; Fang, D.-C. DFT and Topological Study on the Mechanism of Ring Opening of Cyclobutenone, Azetinone and Oxetone. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1999**, *468* (1), 119–125.
- (47) Troisi, L.; Ronzini, L.; Granito, C.; Pindinelli, E.; Troisi, A.; Pilati, T. Synthesis and Isomerization of N- α -aza-heteroaryl- β -Lactams. *Tetrahedron* **2006**, *62* (51), 12064–12070.

- (48) Kozuch, S.; Martin, J. M. L. The Rate-Determining Step is Dead. Long Live the Rate-Determining State! *ChemPhysChem* **2011**, *12* (8), 1413–1418.
- (49) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09, Revision B.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2010.
- (50) *Parallel Quantum Solutions (PQS), Version 4.0*; Green Acres Road 72703, Fayetteville, Arkansas. <http://www.pqs-chem.com>, 2013.
- (51) Scuseria, G. E.; Janssen, C. L.; Schaefer, H. F. An Efficient Reformulation of the Closed-Shell Coupled Cluster Single and Double Excitation (CCSD) Equations. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 7382–7387.
- (52) Pople, J. A.; Head-Gordon, M.; Raghavachari, K. Quadratic Configuration Interaction - A General Technique for Determining Electron Correlation Energies. *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 5968–5975.
- (53) Janowski, T.; Ford, A. R.; Pulay, P. Parallel Calculation of Coupled Cluster Singles and Doubles Wave Functions Using Array Files. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3* (4), 1368–1377.
- (54) Allouche, A.-R. Gabedit—A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (1), 174–182.
- (55) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.

Ciclización de Gould-Jacobs (vía A)



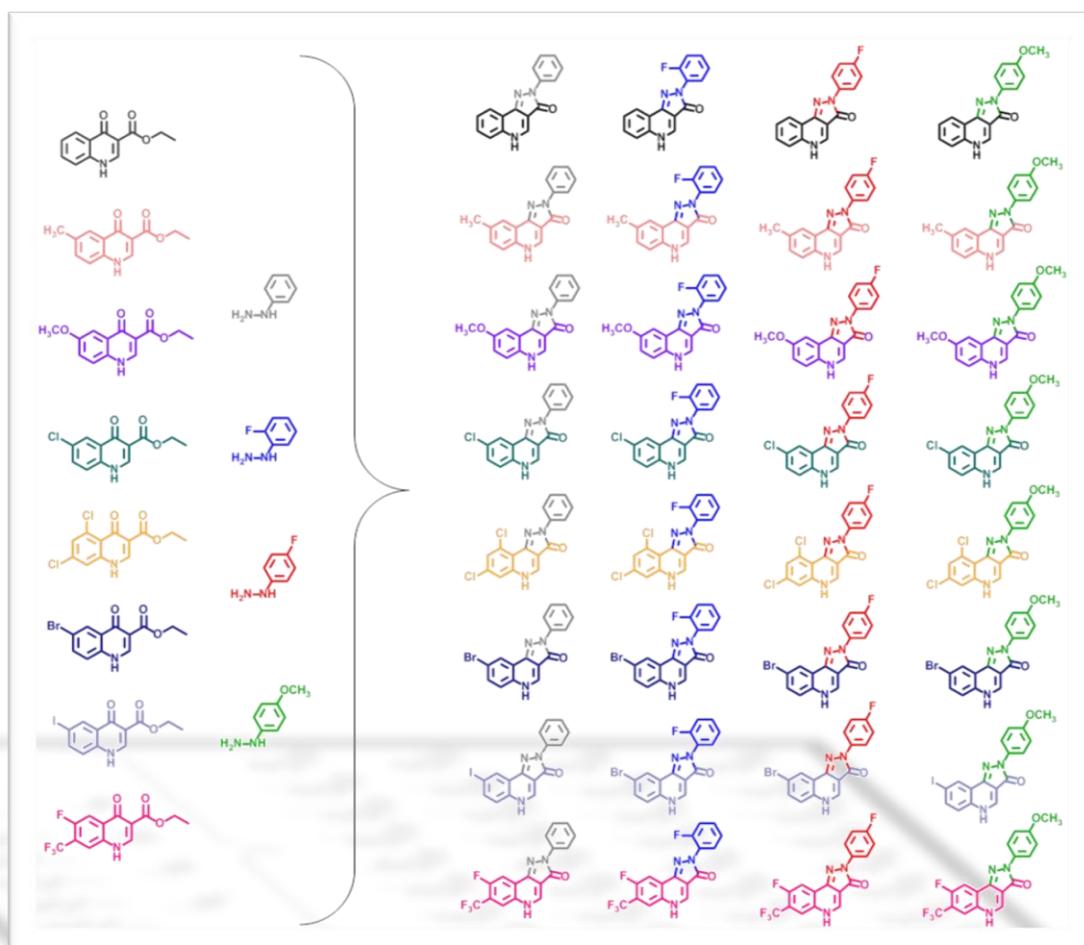
Ciclización de Gould-Jacobs (vía B)



PARTE II

Capítulo 3

Síntesis de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas



3.1.1. Importancia biológica del núcleo de pirazoloquinolinona

Las pirazoloquinolinonas son sistemas tricíclicos conteniendo un anillo de pirazol fusionado a un núcleo de quinolona.¹ En esta tesis, se estudiaron en particular los anillos [4,3-*c*] fusionados como se muestra en la Figura 3.1.

Las pirazolo[4,3-*c*]quinolinonas poseen un amplio rango de actividad biológica, lo que las convirtió en un atractivo blanco de síntesis en los últimos años.

Uno de los principales usos de estos compuestos ha sido como ligandos del complejo receptor del ácido γ -aminobutírico (R-GABA_A), o receptor de las benzodiazepinas (BZR), ejerciendo actividad agonista (agentes ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes), agonista inverso (agentes pro-convulsivantes y ansiogénicos) o antagonista (sin respuesta farmacológica).²⁻⁴ También han sido identificados como nuevos inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa COX-2, reduciendo el dolor y la inflamación,⁵ y como inhibidores de la Topoisomerasa II, lo cual se traduce en un alto nivel de citotoxicidad y actividad antitumoral.^{6,7}

Recientemente, algunas pirazoloquinolin-3-onas se han estudiado como inhibidores de la quinasa *Checkpoint 1* (Chk1). Dicha proteína está involucrada en el control del ciclo celular y su inhibición, junto con la acción de agentes que dañan el ADN, conlleva a la apoptosis de la células cancerígenas, por lo que es considerada como un blanco terapéutico para el tratamiento contra el cáncer.⁸

En la Figura 3.2 se muestran ejemplos de pirazolo[4,3-*c*]quinolonas de uso terapéutico.

3.1. Introducción

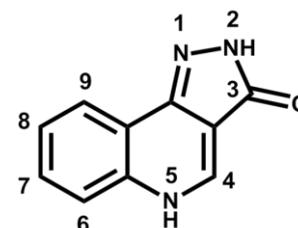


Figura 3.1.
Núcleo de pirazolo[4,3-*c*]quinolinona.

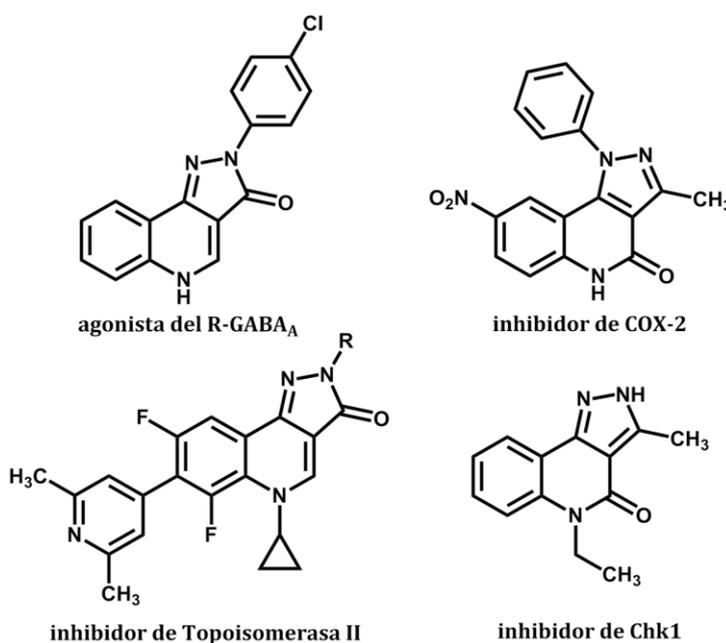


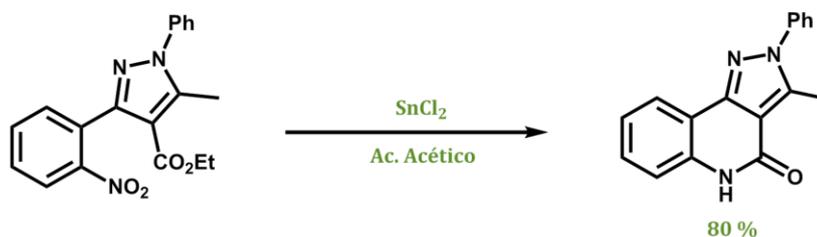
Figura 3.2.
Pirazoloquinolonas de interés medicinal.

3.1.2. Antecedentes de la síntesis de pirazoloquinolonas

Existen numerosas metodologías para la síntesis de este tipo de compuestos, las cuales pueden ser clasificadas en dos categorías:¹

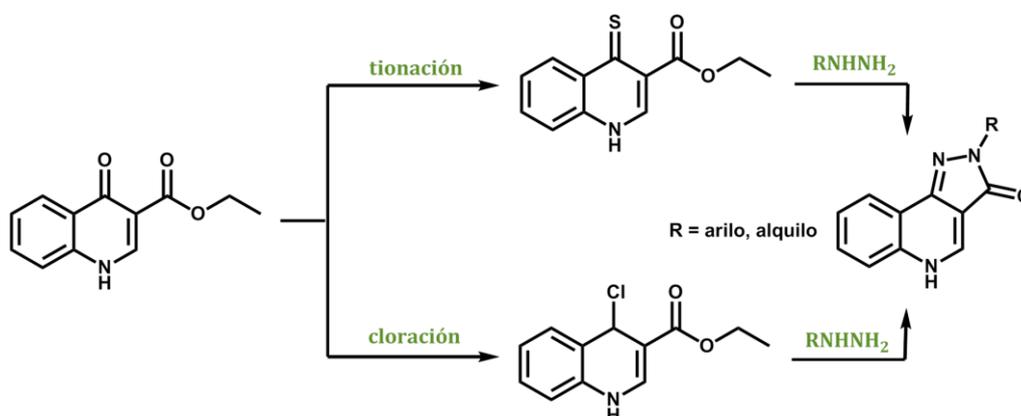
- Formación del anillo de quinolona sobre el núcleo de pirazol.
- Formación del anillo de pirazol sobre el núcleo de quinolona.

En cuanto a la primera categoría, la estrategia más utilizada es a partir de 3-(2-nitrofenil)-1*H*-pirazolcarboxilatos, los cuales, mediante la reducción del grupo nitro a amina y posterior reacción con el grupo carboxilato pueden formar diferentes *N*-heterociclos como se muestra en el siguiente ejemplo (Esquema 3.1).⁹



Esquema 3.1. Obtención de 3-metil-2-fenil-2*H*-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4(5*H*)-ona.

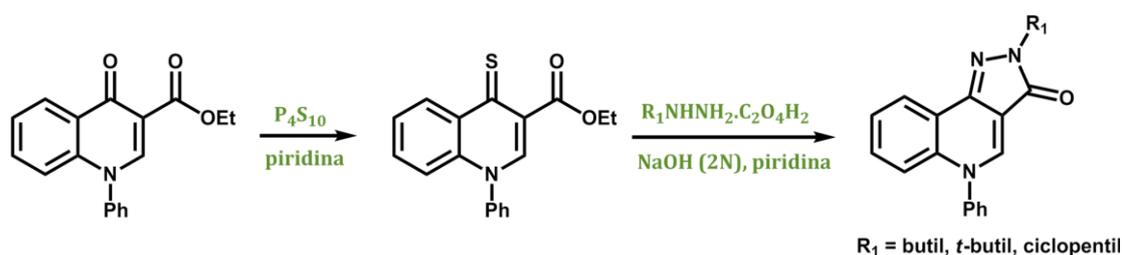
Por su parte, la formación del anillo de pirazol sobre el núcleo de quinolona, requiere de la activación previa de este último. Según los datos reportados en bibliografía, las dos alternativas más utilizadas para activar el anillo de quinolona, previo a la reacción con hidracinas, son la tiónación o la cloración de la misma en posición 4 como se muestra en el Esquema 3.2.



Esquema 3.2. Estrategias para la activación del núcleo de quinolona previo a la formación de pirazoloquinolona.

La tiónación consiste en transformar el grupo carbonilo en un tiocarbonilo ya que este último es más reactivo que su análogo oxigenado. La reactividad de los compuestos organosulfurados se debe a que el enlace C-S es más débil que el C-O debido a la mayor polarizabilidad del azufre, además del bajo coeficiente de solapamiento de los orbitales $C_{2p\pi}-S_{3p\pi}$.¹⁰ Los agentes de tiónación de grupos carbonilos más utilizados son el decasulfuro de fósforo (P_4S_{10}), también llamado pentasulfuro de fósforo (P_2S_5) y el reactivo de Lawesson, los cuales introducen un átomo de azufre como se muestra en la Figura 3.3.^{11,12}

Crespo y colaboradores utilizaron decasulfuro de fósforo (P_4S_{10}) para obtener tioderivados de quinolonas que luego, por reacción con alquilhidracinas, generaron pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3(5*H*)-onas (Esquema 3.3).¹³ Mientras que

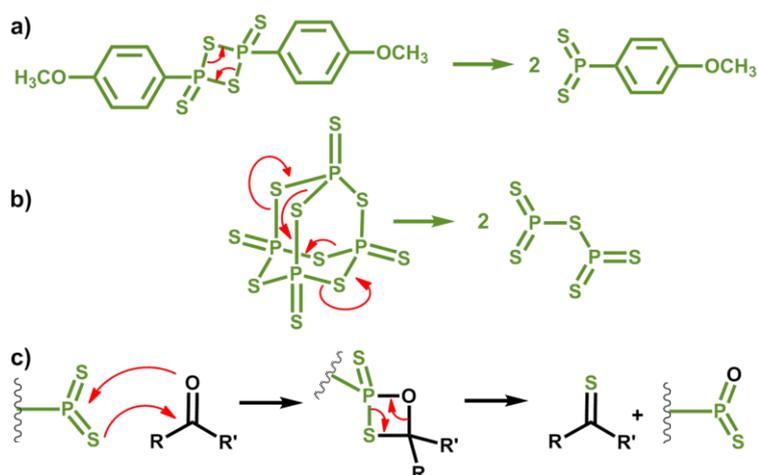


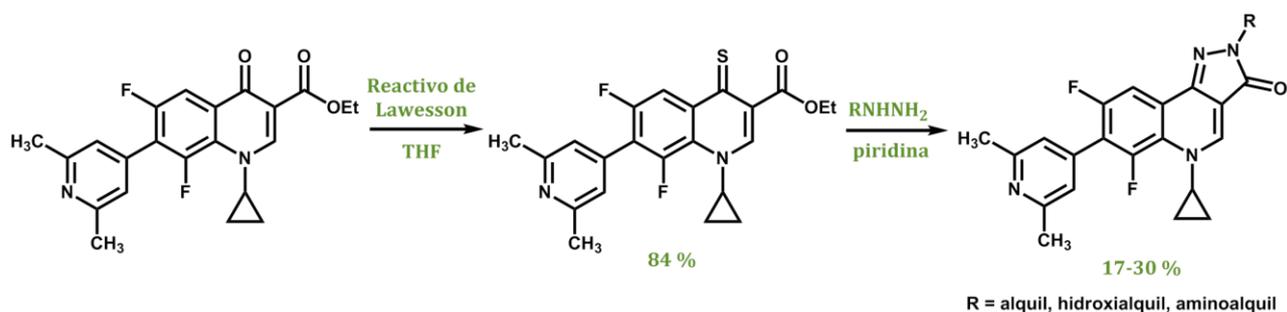
Esquema 3.3. Obtención de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas mediante tiónación con P_4S_{10} .

Wentland y colaboradores reportaron la conversión de 3-carboetoxy-1-ciclopropil-6,8-difluoro-7-(2,6-dimetilpiridinil)quinolin-4-ona al derivado 4-tiona, utilizando el reactivo de Lawesson. Posteriormente, el compuesto 3-carboetoxyquinolin-4-tiona fue tratado con diferentes hidracinas en piridina a reflujo dando las correspondientes pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas (Esquema 3.4).⁷

Figura 3.3.

- Disociación de reactivo de Lawesson,
- Disociación de P_4S_{10}
- Mecanismo de tiónación.





Esquema 3.4. Obtención de 5-ciclopropil-6,8-difluoro-7-(2,6-dimetil-4-piridinil)-5H-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas mediante tionación con reactivo de Lawesson.

La otra alternativa mencionada (cloración) consiste en incorporar un átomo de cloro en posición 4 de la quinolona, el cual es un buen grupo saliente frente a la sustitución nucleofílica de la hidracina. Los agentes clorantes más conocidos son el cloruro de tionilo (SOCl_2),¹⁴ cloruro de oxalilo (COCl_2), oxiclورو de fósforo (POCl_3),^{3,15} tricloruro de fósforo (PCl_3) y la sal de Appel ($\text{Ph}_3\text{P}^+\text{Cl}^- \text{CCl}_3^-$)¹⁶ entre otros. En la Figura 3.4 se muestran los mecanismos de cloración con los agentes mencionados.

Figura 3.4.

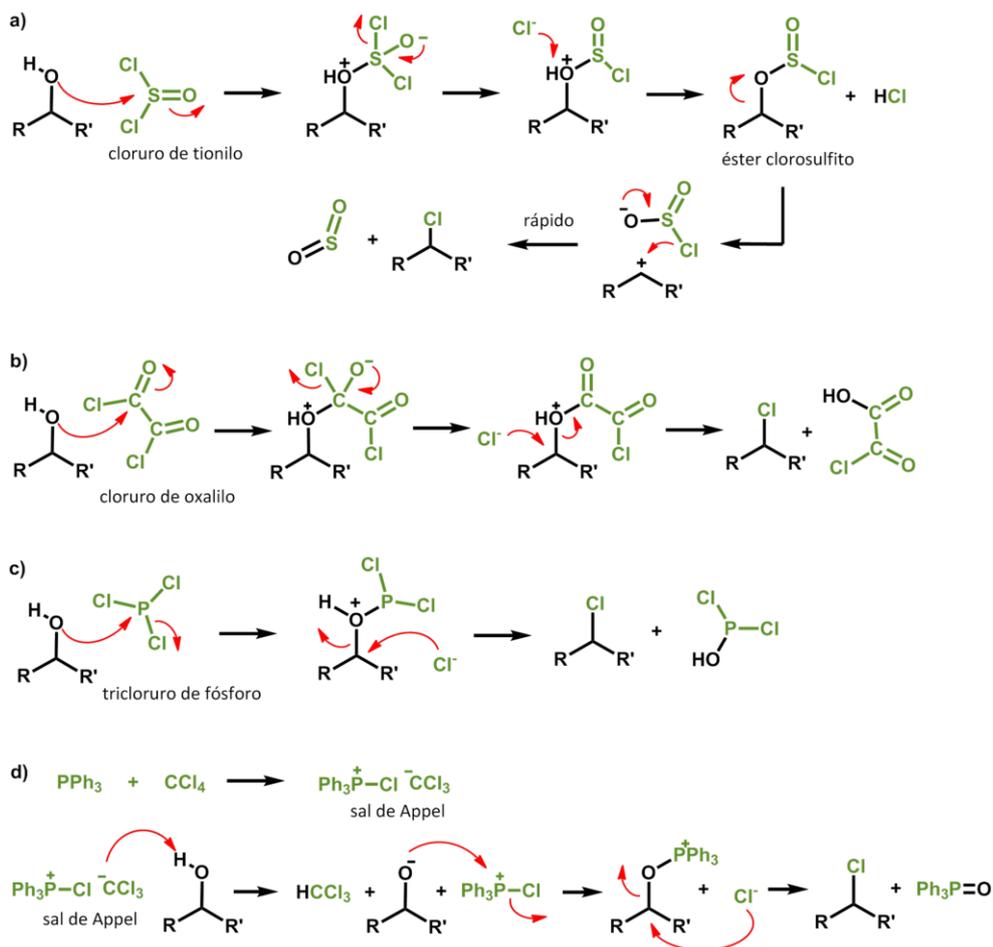
Métodos de cloración con:

a) SOCl_2 ,

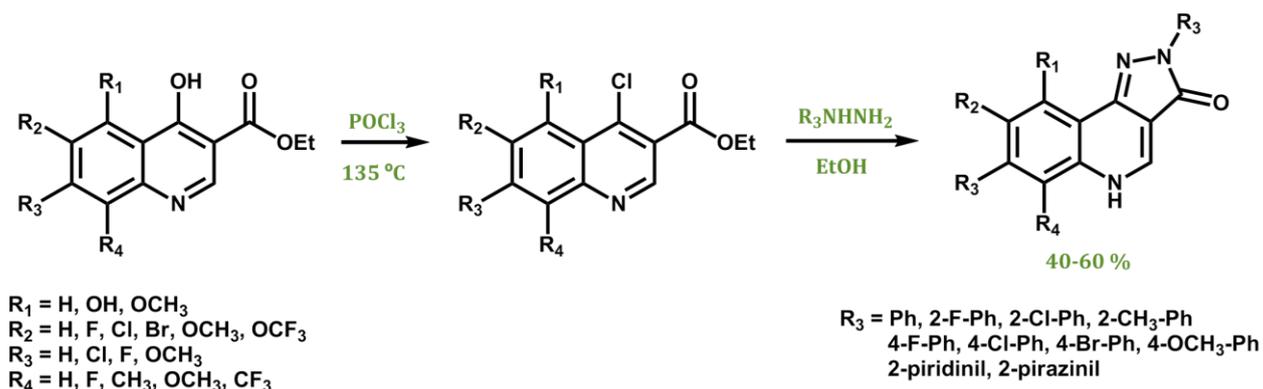
b) COCl_2 ,

c) PCl_3

d) Sal de Appel.

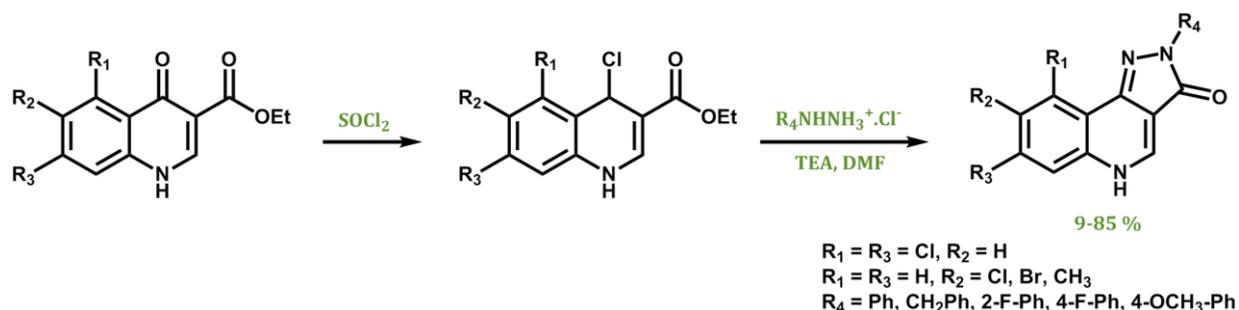


Como ejemplo, cabe destacar la utilización del oxiclорuro de fósforo (POCl_3) en los trabajos descritos por Savini¹⁷ y Carotti³ quienes, junto con Yokoyama,¹⁸ han sido los pioneros en la síntesis de innumerables pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas (Esquema 3.5).



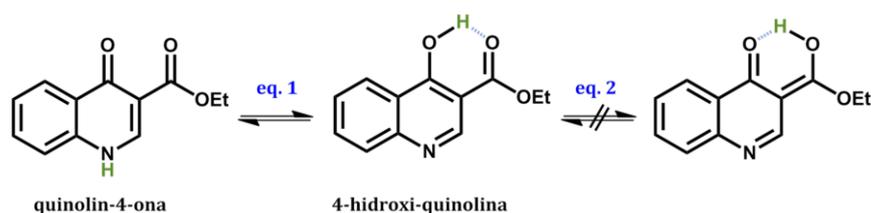
Esquema 3.5. Síntesis de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas mediante cloración con POCl_3 .

Años más tarde, López Rivilli desarrolló una modificación a la metodología de Savini y Carotti utilizando cloruro de tionilo (SOCl_2) para la cloración de la quinolona y luego clorhidratos de bencil- y aril-hidrácinas en trietilamina (TEA) y DMF para la formación del anillo de pirazol (Esquema 3.6).^{4,19}



Esquema 3.6. Síntesis de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas empleando SOCl_2 .

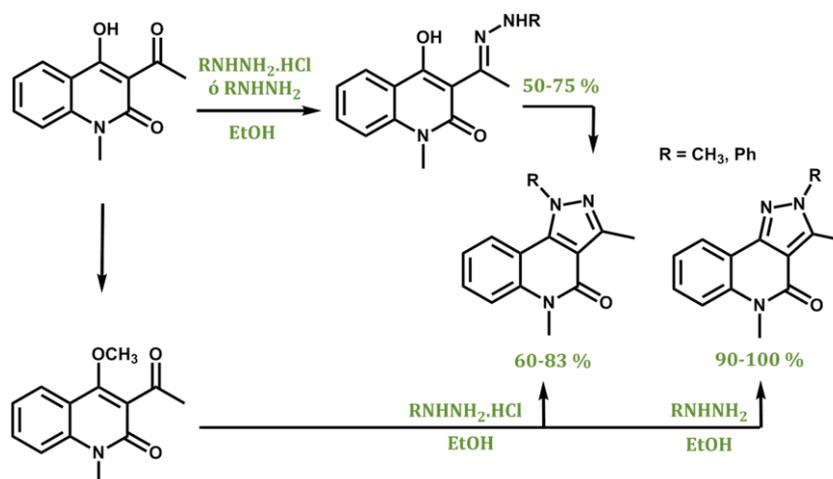
El hecho que la cloración pueda darse con facilidad en la posición 4 de la quinolona se debe a que la misma presenta un tautomerismo tipo ceto-enólico, siendo el tautómero 4-hidroxi-quinolina la forma reactiva (Esquema 3.7).



Esquema 3.7. Equilibrio (eq.) tautomérico de las estructuras 3-carboxietil-quinolin-4-onas.

De los tres tautómeros posibles, solo se consideran los dos primeros (eq.1), porque se conoce que en los β -cetoésteres, es el carbonilo del grupo ceto y no el del grupo éster el que resulta enolizable.²⁰ Mediante espectroscopía de RMN, De la Cruz y colaboradores demostraron que en estado sólido y en solución en DMSO prevalece el tautómero quinolin-4-ona.²⁰ Sin embargo, el desplazamiento del equilibrio depende del núcleo de quinolona y/o el solvente utilizado, ya que Chang y colaboradores demostraron que en derivados de 3-carboetoxi-3,4-dihidro-1*H*-pirano[3,4-*b*]quinolin-4-ona el tautómero enol predomina en estado sólido y en solución en cloroformo, mientras que en DMSO ambas formas tautoméricas están presentes.²¹

Un avance importante en la síntesis de pirazoloquinolinonas fue reportado por Chimichi²² al evitar la etapa de cloración en la síntesis de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4-onas. La misma se llevó a cabo a partir de 3-acetil-4-hidroxi ó 3-acetil-4-metoxi-1-metilquinolin-2(1*H*)-onas e hidracinas en etanol a reflujo (Esquema 3.8).



Esquema 3.8. Síntesis de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-4-onas a partir de 1-metil-quinolin-2-onas e hidracinas.

Este antecedente demuestra que, dependiendo del núcleo de quinolona y en particular del sustituyente en posición 4 y condiciones de reacción, podrían obtenerse los anillos de pirazol mediante la formación de un intermediario imina y su posterior ciclización sobre los núcleos de quinolina.

La presente tesis está dirigida hacia la síntesis de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas a partir de los núcleos de quinolin-4-ona sintetizados previamente (Capítulo 1). Cabe destacar que, si bien hasta el momento no se han encontrado antecedentes de dicha síntesis asistida por MO, su aplicación

podría ser de utilidad para la obtención de estos compuestos debido a las características que presenta esta forma de calentamiento (véase Capítulo 1). Por tales motivos, en este capítulo se plantearon los objetivos específicos detallados en la siguiente sección.

- Analizar la posibilidad de una vía directa para la síntesis de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas a partir de las 3-carboetoxi-quinolin-4-onas sintetizadas previamente.
- Optimizar las condiciones para la síntesis asistida por MO de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas.
- Sintetizar derivados de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas ya sea mediante síntesis convencional o asistida por MO.

3.2.

Objetivos específicos

3.3.1. Optimización de la síntesis asistida por microondas

3.3.1.a. Evaluación de la vía directa

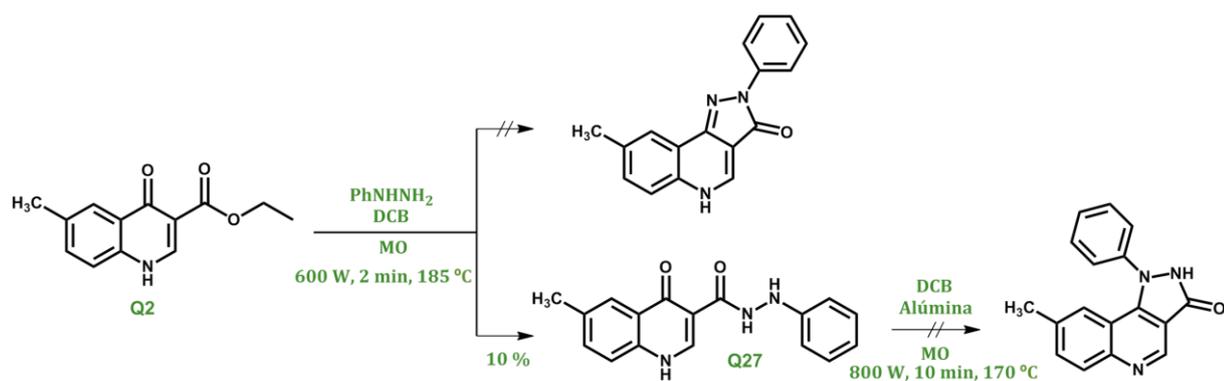
Se comenzó por estudiar la posibilidad de una vía de síntesis directa evitando el uso de agentes nocivos (como POCl₃, SOCl₂) para la etapa de cloración.

Sabiendo que en la reacción entre 3-carboetoxi-quinolin-4-onas y bencilamina se produjo la formación de un enlace **amida**, generando 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas (Capítulo 1), se decidió utilizar otras condiciones, en presencia y ausencia de catalizador, para evaluar si éstos podrían favorecer la formación del anillo de pirazol a través de un intermediario **imina**, como fue observado previamente por Chimichi.²²

Considerando las características particulares de la irradiación con MO, como primera alternativa se llevó a cabo la reacción sin catalizador entre 3-carboetoxi-6-metil-quinolin-4-ona (**Q2**) y fenilhidracina en DCB aplicando 2 min de irradiación en sistema cerrado, a 600 W y 185 °C. Sin embargo, no se obtuvo el producto deseado sino que, como era predecible, se formó la carbohidrazida (**Q27**) correspondiente (Esquema 3.9).

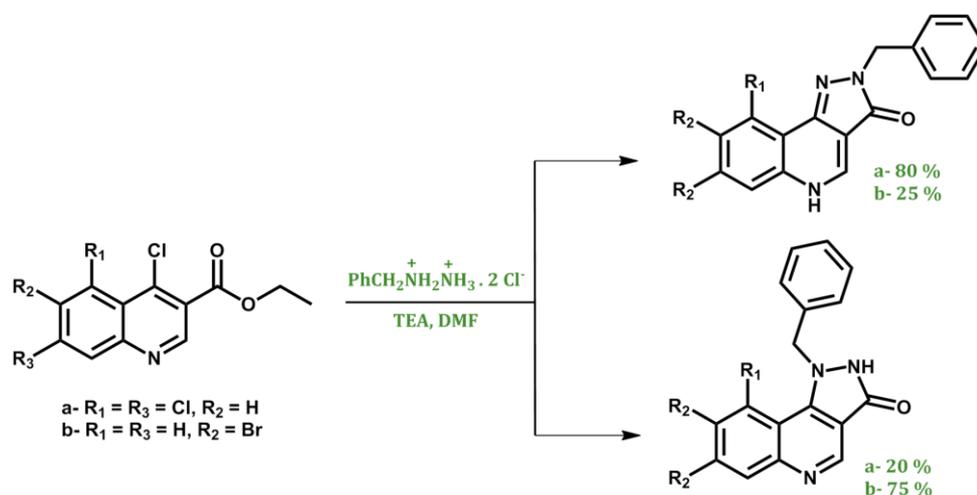
3.3.

Síntesis de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas



Esquema 3.9. Reacción entre 3-carboetoxi-6-metil-quinolin-4-ona y fenilhidrazina.

Asimismo, el calentamiento adicional de **Q27** tampoco produjo la formación de la pirazolona por cierre invertido de anillo (isómero 1-fenil-pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-ona), como fue observado por Lopez Rivilli al tratar 3-carboetoxi-4-cloroquinolinas con bencilhidracina (Esquema 3.10).¹⁹



Esquema 3.10. Formación de isómeros *N*-1 y *N*-2 de pirazoloquinolinonas.

Posteriormente se realizaron otros ensayos añadiendo bentonita ácida o alúmina a la reacción, con el objetivo de activar el grupo carbonilo, evitando la protonación de la fenilhidracina. La presencia de estos catalizadores no modificó el tipo de reacción, obteniéndose nuevamente **Q27**.

El hecho que Chimichi y colaboradores hayan observado la formación del enlace imina, con la consecuente formación del producto deseado, se debe a que la estructura de partida de la quinolona poseía un grupo acetilo en posición 3, el cual no permite la formación de una amida. Por el contrario, en

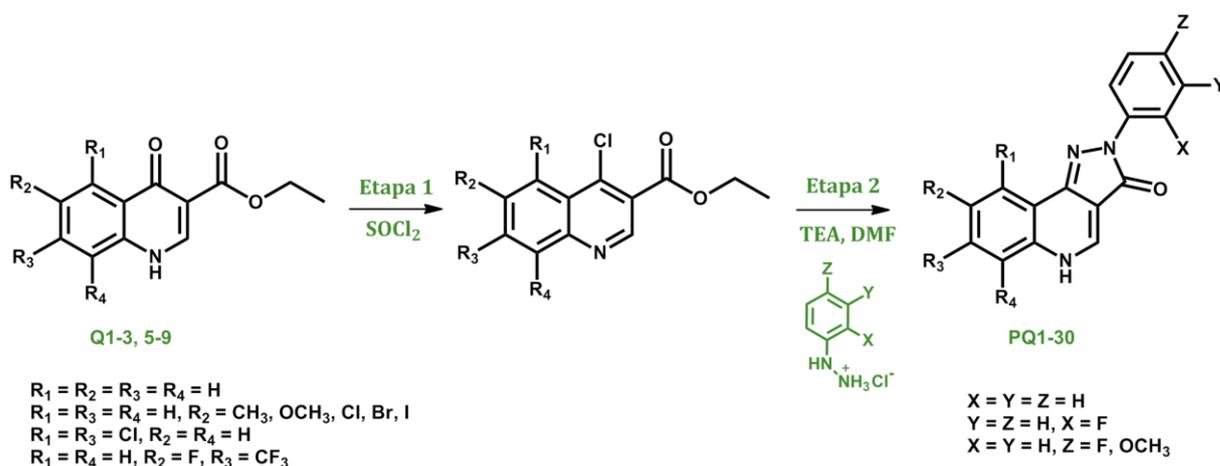
nuestro caso, el grupo 3-carboetoxi de la quinolin-4-ona, puede transformarse con facilidad en el derivado amida correspondiente.

Pese a que mediante esta metodología no fue posible la síntesis de pirazoloquinolin-3-onas, la misma podría ser utilizada para la síntesis de compuestos potencialmente activos ya que se ha demostrado que las 3-carbohidrazida-quinolin-4-onas son potentes antimaláricos.²³

3.3.1.b. Sustitución de calentamiento convencional por microondas

Al no ser posible la síntesis directa de pirazoloquinolin-3-onas, se decidió aplicar la metodología descrita anteriormente que involucra la formación previa de 3-carboetoxi-4-cloroquinolinas.

Para optimizar las condiciones de síntesis asistida por MO de pirazoloquinolin-3-onas se utilizó la quinolona **Q2**. En primera instancia, **Q2** se trató con SOCl_2 irradiando durante 1 min en sistema cerrado a 85 °C, obteniéndose un rendimiento de 3-carboetoxi-6-metil-4-cloroquinolina mayor a 95 % (Etapa 1, Esquema 3.11). Luego de aislar el producto clorado se añadió un exceso de fenilhidracina libre (PhNHNH_2) y se irradió por 1 min en sistema cerrado a 130-150 °C, utilizando DMF como solvente, dando lugar a la formación de 2-fenil-8-metil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona pura en un 88 % de rendimiento (Etapa 2, Esquema 3.11).



Esquema 3.11. Síntesis asistida por MO de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas.

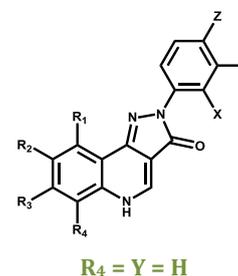
Debido a que la mayoría de las hidracinas se comercializan estabilizadas como clorhidratos para evitar su descomposición, al utilizarse el clorhidrato de fenilhidracina se debió adicionar TEA para permitir la desprotonación del

grupo amino primario y que el mismo pueda realizar la sustitución nucleofílica aromática sobre el anillo de quinolona, desplazando el átomo de cloro. Cabe destacar que los resultados obtenidos utilizando clorhidrato de fenilhidracina/TEA fueron comparables a los rendimientos utilizando la fenilhidracina libre, indicando que la neutralización con TEA fue eficiente.

3.3.2. Síntesis convencional y asistida por microondas de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas

A partir de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas sintetizadas previamente (Capítulo 1) se llevó a cabo la síntesis de diferentes derivados de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas (PQ1-30) mediante calentamiento convencional o irradiación de MO. El tiempo de reacción fue optimizado de acuerdo a los sustituyentes como se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Quimioteca de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas.



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	X	Z	Metodología ^a	Tiempo (min) ^b	Rend. (%) ^c
PQ1	H	H	H	H	H	Convencional	60 + 120	70
PQ2	H	H	H	F	H	Convencional	60 + 90	78
PQ3	H	H	H	H	F	Microondas	1 + 5	90
PQ4	H	H	H	H	OCH ₃	Convencional	60 + 120	63
PQ5	H	CH ₃	H	H	H	Microondas	1 + 1	88
PQ6	H	CH ₃	H	F	H	Convencional	60 + 210	79 (63)
PQ7	H	CH ₃	H	H	F	Microondas	1 + 1	78 (60)
PQ8	H	CH ₃	H	H	OCH ₃	Microondas	1 + 1	75 (69)
PQ9	H	OCH ₃	H	H	H	Microondas	1 + 4	73
PQ10	H	OCH ₃	H	F	H	Convencional	60 + 180	73
PQ11	H	OCH ₃	H	H	F	Microondas	1 + 5	70 (42)
PQ12	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	Microondas	1 + 4	64 (38)
PQ13	H	Cl	H	H	H	Convencional	120 + 150	55 (36)
PQ14	H	Cl	H	F	H	Microondas	2 + 2	67 (40)
PQ15	H	Cl	H	H	F	Microondas	2 + 2	59 (31)
PQ16	H	Cl	H	H	OCH ₃	Microondas	2 + 2	92 (56)

Tabla 3.1. Continuación

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	X	Z	Metodología ^a	Tiempo (min) ^b	Rend. (%) ^c
PQ17	Cl	H	Cl	H	H	Convencional	120 + 150	89 (71)
PQ18	Cl	H	Cl	F	H	Microondas	2 + 2	61 (35)
PQ19	Cl	H	Cl	H	F	Convencional	120 + 90	87 (40)
PQ20	Cl	H	Cl	H	OCH ₃	Convencional	120 + 90	85 (41)
PQ21	H	Br	H	H	H	Convencional	90 + 60	92 (73)
PQ22	H	Br	H	F	H	Convencional	90 + 210	91 (66)
PQ23	H	Br	H	H	F	Convencional	90 + 180	90 (76)
PQ24	H	Br	H	H	OCH ₃	Convencional	90 + 150	90 (56)
PQ25	H	I	H	H	H	Microondas	4 + 5	56 (27)
PQ26	H	I	H	H	OCH ₃	Convencional	120 + 120	53 (23)
PQ27	H	F	CF ₃	H	H	Microondas	3 + 5	57 (15)
PQ28	H	F	CF ₃	F	H	Convencional	120 + 120	87 (55)
PQ29	H	F	CF ₃	H	F	Convencional	120 + 120	95 (74)
PQ30	H	F	CF ₃	H	OCH ₃	Convencional	120 + 150	72 (43)

a- Convencional: Etapa 1 a reflujo de SOCl₂ y Etapa 2 a 130-140 °C. Microondas: Etapa 1 en sistema cerrado, potencia variable a 85 °C y Etapa 2 en sistema cerrado, 300 W, 130-150 °C. **b-** Tiempo Etapa 1 + tiempo Etapa 2. **c-** Rendimiento de producto aislado; calculado a partir de los moles de 3-carboetoxi-quinolin-4-ona. Entre paréntesis se indica el rendimiento luego del proceso de purificación.

Cuando se empleó calentamiento por MO los tiempos requeridos para la Etapa 1 (cloración) fueron 1-4 min y para la Etapa 2 (ciclización) 1-5 min. Mientras que por calentamiento convencional los mismos fueron 1-2 h y 1-3,5 h respectivamente.

En cuanto a los rendimientos de la reacción, cabe destacar que la primer etapa fue cuantitativa en todos los casos (> 90 %), por lo que los rendimientos globales obtenidos (15-90 %) dependieron en mayor medida de la etapa de formación del anillo de pirazolona.

Una vez más, la irradiación de MO resultó útil como una metodología sintética alternativa ya que permitió reducir los tiempos de reacción de horas a minutos, obteniéndose, en general, los mismos rendimientos que en los procesos de calentamiento convencional.

Todos los reactivos empleados fueron de grado comercial y la mayoría se utilizaron sin previa purificación, excepto fenilhidracina y cloruro de tionilo (SOCl₂) que debieron ser destilados para su utilización. Los solventes diclorometano (CH₂Cl₂) y cloroformo (CHCl₃) fueron destilados previamente

3.4.

Sección experimental

a su uso. Se utilizó DMF de calidad grado analítico, la cual fue secada sobre tamices moleculares (4 Å). Las cromatografías en capa delgada (TLC, por sus siglas en inglés) se realizaron con sílica-gel Merck (60 DGF254).

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C fueron realizados en un equipo Bruker Advance II FT-400 MHz (^1H a 400,16 y ^{13}C a 100,56 MHz) utilizando $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Los corrimientos químicos (δ) se encuentran informados en partes por millón (ppm) tomando como referencia la señal residual de los solventes utilizados y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

La caracterización de los compuestos sintetizados se encuentra en la sección ANEXO (páginas XIX-XXV).

3.4.1. Metodología convencional

Los compuestos pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas (**PQ1-2, 4, 6, 10, 13, 17, 19-24, 26, 28-30**) se sintetizaron siguiendo la metodología descrita por López-Rivilli.^{4,19} La misma consistió en colocar 0,15 g (0,44-0,69 mmol) de quinolona sintetizada previamente (**Q1-3, 5-9**) y 1 mL de SOCl_2 en un balón sumergido en un baño de glicerina para calentamiento. Dicho balón estaba acoplado a un equipo de reflujo con trampa de vidrio conteniendo CaCl_2 para impedir el ingreso de humedad al mismo.

La formación de 3-carboetoxi-4-cloro-quinolinas (Etapa 1, Esquema 3.11) se llevó a cabo a la temperatura de reflujo del SOCl_2 (79 °C) durante 1-2 h dependiendo del sustrato. El seguimiento de la reacción fue realizado mediante TLC y, una vez completada la misma, se evaporó el exceso de SOCl_2 observándose la aparición de un sólido amarillento. Este sólido fue re-disuelto en CH_2Cl_2 (10 mL), el cual posteriormente fue evaporado para facilitar la eliminación de SOCl_2 residual. Este producto se obtuvo en condiciones óptimas de pureza para ser utilizado en la siguiente etapa.

Para continuar con la reacción hacia la formación de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas, al compuesto 3-carboetoxi-4-cloro-quinolina se le agregó un 20 % de exceso de clorhidrato de hidracina, previamente neutralizado con los moles necesarios de TEA, y 3 mL de DMF. La mezcla se calentó hasta alcanzar 130-140 °C en el mismo equipo de reflujo utilizado en la etapa anterior, durante 1-3,5 h, dependiendo del tiempo requerido para cada sustrato (Tabla 3.1). El seguimiento de la reacción fue controlado por TLC hasta observar desaparición de 3-carboetoxi-4-cloro-

quinolina. Finalizada la misma, el crudo se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se vertió sobre agua destilada fría para favorecer la precipitación del producto (**PQ**), el cual luego se filtró al vacío y se lavó con cantidad suficiente de agua destilada, acetona y hexanos para la completa remoción de los reactivos en exceso.

Finalmente, se procedió a la purificación de **PQ6, 13, 17, 19-21, 28-29** mediante recristalización de EtOH: H₂O (96:4) y de **PQ19-20, 22-24, 26, 30** mediante cromatografía en columna utilizando como solvente de elución una mezcla de CHCl₃: EtOH (9:1); mientras que los productos **PQ1-2, 4, 10** fueron obtenidos puros.

3.4.2. Síntesis asistida por microondas

La evaluación de la vía directa de síntesis de **PQ** se realizó en un equipo de MO monomodo de la firma Anton Paar.

Para la síntesis asistida por MO de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas (**PQ3, 5, 7-9, 11-12, 14-16, 18, 25, 27**) se empleó un equipo CEM Discovery monomodo. En primer lugar, una mezcla de 0,15 g (0,44-0,69 mmol) de quinolona sintetizada previamente (**Q1-3, 5-6, 8-9**) y 1 mL de SOCl₂ fue irradiada en sistema cerrado utilizando un método dinámico de potencia durante 1-4 min a 85 °C (Etapa 1). Posteriormente, se procedió a aislar el producto 3-carboetoxi-4-cloro-quinolina de la misma manera que en la metodología convencional descrita anteriormente.

Para continuar con la reacción hacia la formación de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas, al producto de la etapa anterior se le agregó un exceso (20 %) de clorhidrato de hidracina, TEA para neutralizar la cantidad de hidracina y 2 mL de DMF. Luego, la mezcla fue irradiada en sistema cerrado utilizando un método de potencia fija (300 W) a 140 ± 10 °C, durante 1-5 min (Tabla 3.1).

Finalizada la reacción, el procesado de los productos fue realizado del mismo modo que en la metodología convencional. Por último, **PQ7, 11-12, 14-15, 18** fueron purificados mediante recristalización de EtOH: H₂O (96:4) y **PQ8, 16, 25, 27** mediante cromatografía en columna utilizando como solvente de elución una mezcla de CHCl₃: EtOH (9:1); mientras que los productos **PQ3, 5, 9** fueron obtenidos puros.

3.5.

Conclusiones

La síntesis directa de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas a partir de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas e hidracinas, no fue viable bajo las condiciones estudiadas. Sin embargo, bajo estas condiciones se obtuvo un derivado carbohidrazida, ya que la presencia del grupo 3-carboetoxi de la quinolin-4-ona favorece el ataque de la hidracina a este grupo, generando un enlace amida.

Al no ser posible la alternativa directa, se optimizó la síntesis asistida por MO empleando SOCl_2 para generar el derivado 3-carboetoxi-4-cloro-quinolina y, a partir del mismo generar los anillos de pirazoles. Este paso se realizó en sistema cerrado, irradiando por 1-2 min a 85 °C, obteniéndose rendimientos mayores a 90 % en todos los casos. El tratamiento de la quinolona clorada con clorhidratos de hidracinas en TEA y DMF dio lugar a los derivados de pirazoloquinolinonas, luego de 1-5 min de irradiación en sistema cerrado a 130-150 °C.

Se sintetizaron treinta derivados de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas bajo las condiciones detalladas anteriormente o aplicando la metodología convencional previamente descrita por López Rivilli, obteniéndose rendimientos pobres a excelentes (15-90 %). En algunos casos, los rendimientos fueron mejores empleando irradiación de MO, mientras que otras veces el calentamiento convencional arrojó mejores resultados.

Una vez más, el MO resultó útil como una vía sintética alternativa ya que permitió reducir los tiempos de reacción de horas a minutos.

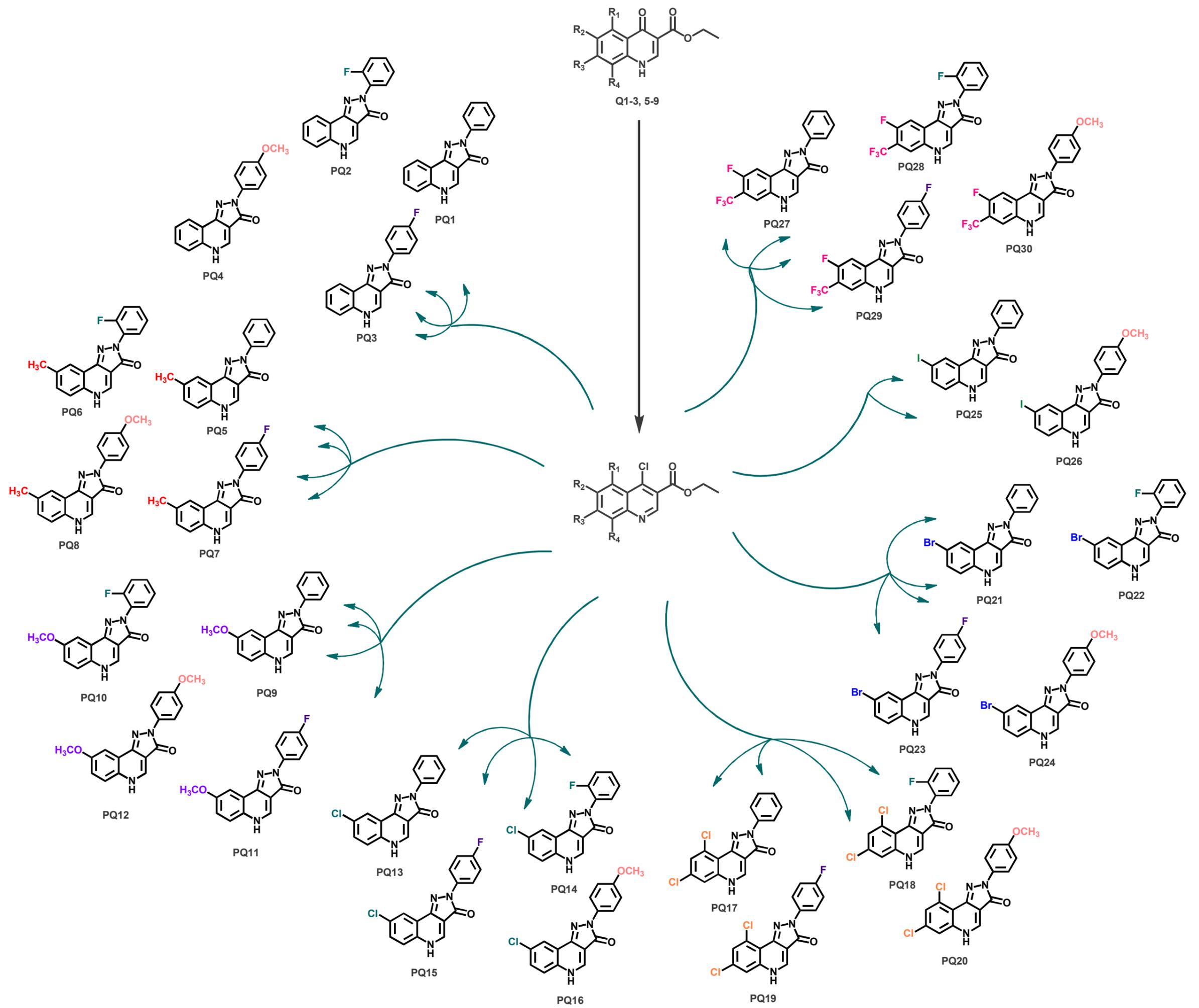
3.6.

Referencias bibliográficas

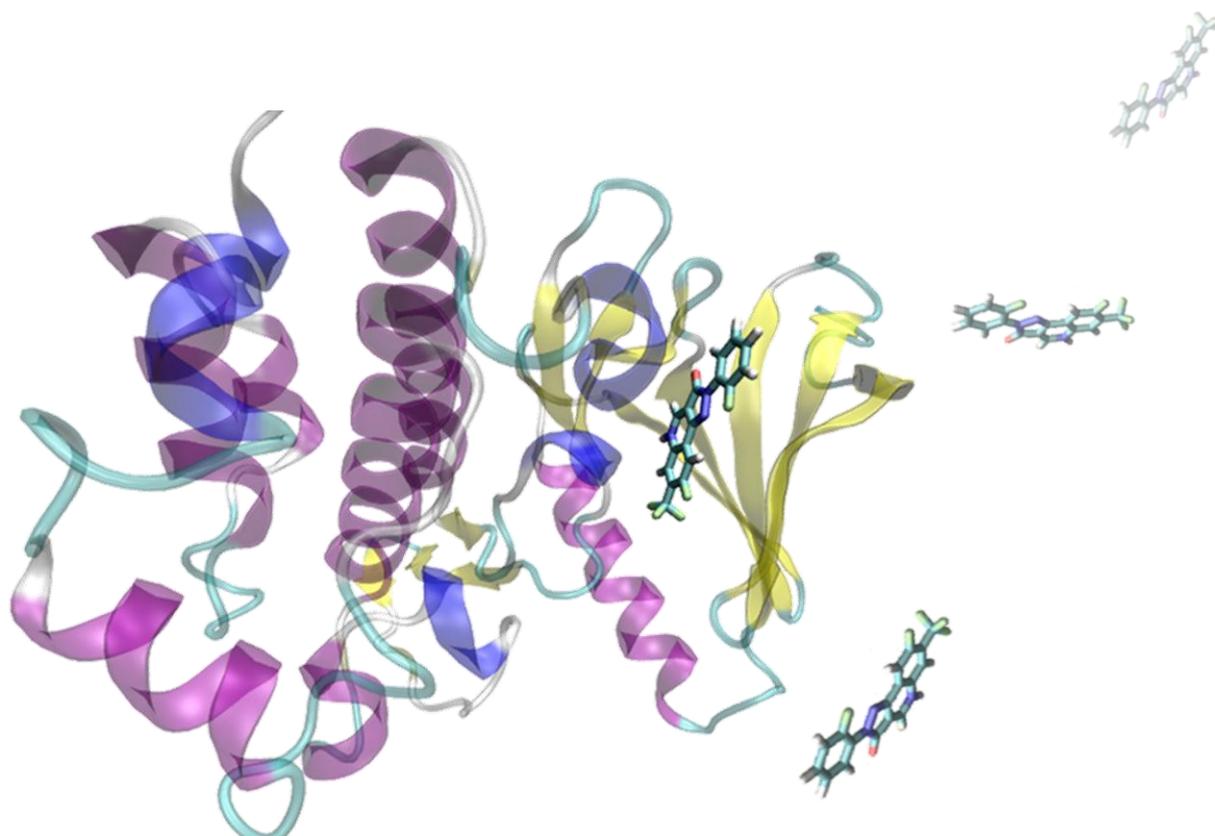
- (1) Mekheimer, R. A.; Ahmed, E. A.; Sadek, K. U. Recent Developments in the Chemistry of pyrazolo[4,3-*c*]quinolines. *Tetrahedron* **2012**, *68* (6), 1637-1667.
- (2) Savini, L.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Biggio, G.; Maciocco, E.; Serra, M.; Cinone, N.; Carrieri, A.; Altomare, C.; Carotti, A. High Affinity Central Benzodiazepine Receptor Ligands. Part 2: Quantitative Structure-Activity Relationships and Comparative Molecular Analysis of Pyrazolo[4,3-*c*]quinolin-3-ones. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 431-444.
- (3) Carotti, A.; Altomare, C.; Savini, L.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Mascia, M. P.; Maciocco, E.; Busonero, F.; Mameli, M.; Biggio, G.; et al. High Affinity Central Benzodiazepine Receptor Ligands. Part 3: Insights into the Pharmacophore and Pattern Recognition Study of Intrinsic Activities of pyrazolo[4,3-*c*]quinolin-3-ones. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (23), 5259-5272.

- (4) López Rivilli, M. J. Nuevos Derivados Bioactivos de Quinolonas. Síntesis y Estudio de su Comportamiento en el Receptor de las Benzodiazepinas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, **2010**.
- (5) Baruah, B.; Dasu, K.; Vaitilingam, B.; Vanguri, A.; Rao Casturi, S.; Rao Yeleswarapu, K. 1,2-diaryl-1-ethanone and Pyrazolo [4,3-c]quinoline-4-one as Novel Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (2), 445–448.
- (6) Wentland, M. P. Pyrazoloquinolones as Anticancer Agents. US5334595A, August 2, 1994.
- (7) Wentland, M. P.; Aldous, S. C.; Gruett, M. D.; Perni, R. B.; Powles, R. G.; Danz, D. W.; Klingbeil, K. M.; Peverly, A. D.; Robinson, R. G.; Corbett, T. H.; et al. The Antitumor Activity of Novel Pyrazoloquinoline Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5* (4), 405–410.
- (8) Brnardic, E. J.; Garbaccio, R. M.; Fraley, M. E.; Tasber, E. S.; Steen, J. T.; Arrington, K. L.; Dudkin, V. Y.; Hartman, G. D.; Stirdivant, S. M.; Drakas, B. A.; et al. Optimization of a Pyrazoloquinolinone Class of Chk1 Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (21), 5989–5994.
- (9) Melani, F.; Cecchi, L.; Palazzino, G.; Filacchioni, G.; Martini, C.; Pennacchi, E.; Lucacchini, A. Pyrazolo[4,5-c]quinolines. 3. Synthesis, Receptor Binding, and ¹³C NMR Study. *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75* (12), 1175–1179.
- (10) Crich, D.; Quintero, L. Radical Chemistry Associated with the Thiocarbonyl Group. *Chem. Rev.* **1989**, *89* (7), 1413–1432.
- (11) Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. A Berzelius Reagent, Phosphorus Decasulfide (P₄S₁₀), in Organic Syntheses. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3419–3478.
- (12) Polshettiwar, V.; Kaushik, M. P. Recent Advances in Thionating Reagents for the Synthesis of Organosulfur Compounds. *J. Sulfur Chem.* **2006**, *27* (4), 353–386.
- (13) Crespo, M. I.; Gràcia, J.; Puig, C.; Vega, A.; Bou, J.; Beleta, J.; Doménech, T.; Ryder, H.; Segarra, V.; Palacios, J. M. Synthesis and Biological Evaluation of 2,5-dihydropyrazolo[4,3-c]quinolin-3-ones. A Novel Series of PDE 4 Inhibitors with Low Emetic Potential and Antiasthmatic Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (23), 2661–2664.
- (14) El-Sakka, I. A.; Hassan, N. A. Synthetic Uses of Thionyl Chloride. *J. Sulfur Chem.* **2005**, *26* (1), 33–97.
- (15) Arnott, E. A.; Chan, L. C.; Cox, B. G.; Meyrick, B.; Phillips, A. POCl₃ Chlorination of 4-quinazolones. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (6), 1653–1661.
- (16) Appel, R. Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14* (12), 801–811.
- (17) Savini, L.; Massarelli, P.; Nencini, C.; Pellerano, C.; Biggio, G.; Maciocco, A.; Tuligi, G.; Carrieri, A.; Cinone, N.; Carotti, A. High Affinity Central Benzodiazepine Receptor Ligands: Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of a New Series of Pyrazolo[4,3-c]quinolin-3-ones. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 389–399.
- (18) Yokoyama, N.; Ritter, B.; Neubert, A. D. 2-arylpyrazolo[4,3-c]quinolin-3-ones: A Novel Agonist, a Partial Agonist and an Antagonist of Benzodiazepines. *J. Med. Chem.* **1982**, *25* (4), 337–339.

- (19) López Rivilli, M. J.; Moyano, E. L.; Yranzo, G. I. An Alternative Approach toward 2-aryl-2*H*-pyrazolo[4,3-*c*]quinolin-3-ones by a Multistep Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (3), 478–481.
- (20) De la Cruz, A.; Elguero, J.; Goya, P.; Martínez, A. Tautomerism and Acidity in 4-quinolone-3-carboxylic Acid Derivatives. *Tetrahedron* **1992**, *48* (29), 6135–6150.
- (21) Chang, M.-Q.; Gao, F.; Li, Y.; Gao, W.-T. Synthesis and Keto-Enol Tautomerism of Ethyl 4-oxo-3,4-dihydro-1*H*-pyrano[3,4-*b*]quinoline-3-carboxylate. *Chem. Pap.* **2013**, *67* (4), 437–443.
- (22) Chimichi, S.; Boccalini, M.; Matteucci, A. Regioselective Synthesis of 2,5-dihydro-4*H*-pyrazolo[4,3-*c*]quinolin-4-ones by the Cyclization of 3-acyl-4-methoxy-1-methylquinolinones with Hydrazines. *Tetrahedron* **2008**, *64* (39), 9275–9279.
- (23) Kurasawa, Y.; Yoshida, K.; Yamazaki, N.; Kaji, E.; Sasaki, K.; Zamami, Y.; Sakai, Y.; Fujii, T.; Ito, H. Quinolone Analogs 11: Synthesis of Novel 4-quinolone-3-carbohydrazide Derivatives with Antimalarial Activity. *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, *49* (2), 288–292.



Modelado computacional de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas en el sitio activo de la quinasa Checkpoint 1 (Chk1). Ensayo in vitro de actividad inhibitoria



4.1.1. Aspectos generales de la Química Medicinal

La Química Medicinal es la ciencia que tiene como objetivo el diseño y descubrimiento de nuevos fármacos, tratando de elucidar la relación existente entre su estructura, sus propiedades químicas y su respuesta biológica.

Dado que la mayor parte de los fármacos son de naturaleza orgánica, la Química Medicinal se fundamenta principalmente en el conocimiento de la Química Orgánica, aunque se requiere también una base sólida de Bioquímica y un complemento con la Farmacología y la Toxicología entre otras (Figura 4.1).

En general, para lograr los objetivos propuestos en Química Medicinal se requieren tres etapas:

- El **descubrimiento**, es decir, la identificación de nuevos principios activos los cuales son llamados compuestos líderes o cabezas de serie. Dichos compuestos pueden ser de origen sintético, de fuentes naturales o de procesos biotecnológicos.
- La **optimización**, que consiste básicamente en la modificación química del compuesto líder para aumentar su potencia, selectividad y/o disminuir su toxicidad.
- El **desarrollo**, el cual implica la optimización de procesos que permitan obtener el fármaco en grandes cantidades, además de mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacotécnicas, para que resulten más adecuados para su uso terapéutico.^{1,2}

Aunque en sus orígenes la Química Medicinal se basó principalmente en la modificación de productos naturales, hoy en día esta disciplina está orientada hacia el estudio de las interacciones del fármaco con las dianas biológicas a nivel molecular. Este hecho se debe en parte al desarrollo de compuestos cabezas de serie más sofisticados gracias a la

4.1.

Introducción



Figura 4.1.

Interrelación de las diversas disciplinas que inciden en la Química Medicinal.

Química Orgánica. En este sentido, merece especial consideración el desarrollo de métodos estereoselectivos, procesos sintéticos automatizados, métodos cromatográficos (analíticos y preparativos) y métodos de análisis estructural como RMN, difracción de rayos X, etc. Por otra parte, el desarrollo de la Biología Molecular y la Ingeniería Genética han permitido el estudio de moléculas diana como receptores de membrana, enzimas y ácidos nucleicos. Incluso, en muchos casos se han determinado las características tridimensionales del sitio activo donde ejercen su acción varios de los fármacos conocidos hasta el momento. Es por esto que, en la actualidad, gran parte del diseño de nuevos fármacos se basa en el estudio de la interacción fármaco-receptor mediante el modelado molecular.^{2,3}

4.1.1.a. Estrategias en la búsqueda de nuevos fármacos

La mayoría de los compuestos cabeza de serie encontrados hasta la década de los años setenta procedían de descubrimientos al azar. No obstante, con los avances en diferentes áreas de la ciencia se han desarrollado métodos más racionales basados en el conocimiento y regulación de las dianas biológicas, como así también en el conocimiento de las disfunciones bioquímicas que originan ciertos procesos patológicos.

Dentro de los diversos procesos utilizados para el descubrimiento de nuevos fármacos pueden distinguirse cuatro estrategias fundamentales:

- **Estudio u observación casual de los efectos biológicos de productos de origen natural o sintético.** El origen de muchos fármacos procede de la medicina popular o del descubrimiento accidental de la acción curativa de algunos compuestos naturales. Se estima que alrededor de un 50 % de los fármacos disponibles en la actualidad provienen de algún producto natural, en especial de origen vegetal, como los alcaloides (atropina, morfina, reserpina, etc.) que fueron la fuente de varios compuestos cabeza de serie.
- **Cribado sistemático (o *screening*) de familias de compuestos, generalmente elegidas al azar, en determinados ensayos biológicos.** Esta estrategia ha sido muy utilizada en los últimos años tanto por el surgimiento de la química combinatoria que permite obtener una gran diversidad de compuestos (denominados colectivamente quimiotecas) en forma rápida, simultánea y eficiente como por la automatización de los ensayos biológicos. Este

procedimiento se conoce como cribado de alta eficacia o HTS, por sus siglas en inglés: *High Throughput Screening* y constituye uno de los métodos más empleados en la actualidad por las compañías farmacéuticas para la búsqueda de compuestos con un perfil de actividad prometedor.

- **Mejora de los fármacos ya existentes.** La finalidad de esta estrategia es optimizar tanto el perfil terapéutico o toxicológico como las propiedades fisicoquímicas de fármaco, de manera que resulten más apropiadas para las formulaciones galénicas del medicamento o que constituyan una mejora en sus características organolépticas.
- **Diseño racional.** En general se basan en el conocimiento de los procesos bioquímicos relacionados con la patología que se pretende combatir, en analogía estructural con un ligando endógeno o en la generación de colecciones de compuestos a partir de una diana terapéutica determinada. En este sentido, el diseño de fármacos asistido por computadoras (CADD, del inglés *Computer Assisted Drug Design*) constituye una de las estrategias de más reciente desarrollo para tal fin.²

En la siguiente sección se realiza una breve descripción de algunas de las técnicas utilizadas en CADD.

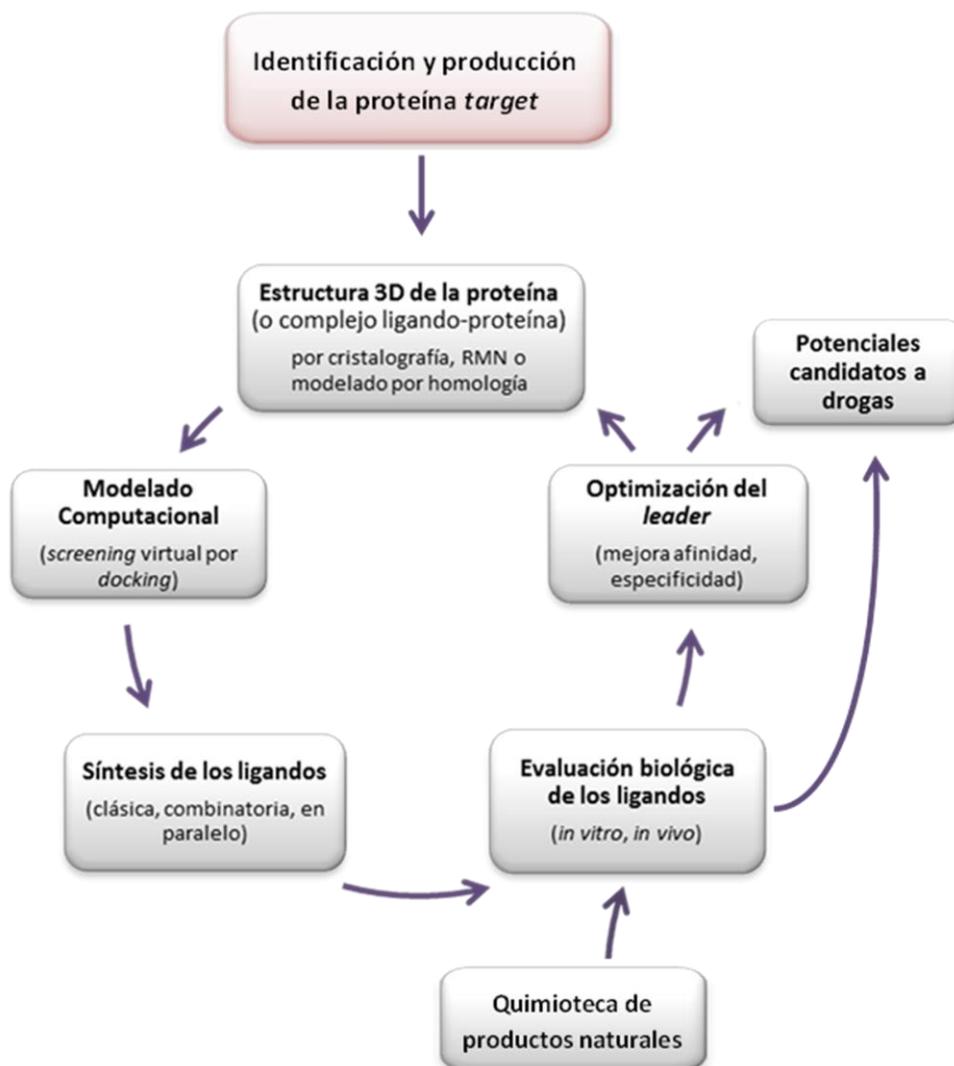
4.1.2. La Química Computacional en el diseño de fármacos

El notable crecimiento en la espectroscopía de proteínas y la cristalografía de rayos X permitieron identificar la estructura tridimensional de numerosos receptores involucrados en diversas patologías. Este hecho, hizo posible el desarrollo de técnicas de simulación computacional para el diseño y optimización de ligandos en función de la complementariedad geométrica y electrónica con el sitio activo o con cualquier otra porción de la molécula diana, como puede ser un sitio alostérico.

Actualmente existen numerosos programas (*software*) de modelado molecular que permiten hacer un diseño racional de nuevos ligandos mediante diferentes estrategias *in silico* como *docking*, *virtual screening* (VS), dinámica molecular (DM) y *Quantitative Structure Activity Relationship* (QSAR), entre otras. Si bien estos programas son de gran utilidad, es importante destacar que los algoritmos utilizados tienen ciertas limitaciones ya que se utilizan muchas aproximaciones. Por consiguiente, a la hora de utilizar estas metodologías se debe tener en cuenta que las mismas deben

Figura 4.2.

Ciclo iterativo para el descubrimiento y elaboración de fármacos.



ser complementadas con estudios adicionales (como la actividad *in vitro*) para identificar el mejor ligando para el receptor en estudio. Además, es importante destacar que la accesibilidad sintética y el diseño iterativo son esenciales. Esto es, los ligandos propuestos deben ser fácilmente sintetizables en un tiempo considerable, ya que rara vez ocurre que el primer compuesto diseñado sea el final. Por lo tanto, si las moléculas propuestas no son biológicamente activas, se debe volver al ciclo de diseño (Figura 4.2), e iterar tantas veces como sea necesario hasta que se identifique el ligando con el potencial terapéutico adecuado para su posterior desarrollo.¹

4.1.2.a. Cálculos de Mecánica Molecular (MM)

Mientras que los métodos computacionales descriptos en el Capítulo 2 pertenecen a la clase de métodos cuánticos, los cuales son más precisos pero apropiados solo para sistemas pequeños; en este capítulo se introducirán los métodos de mecánica clásica, los cuales son adecuados para el estudio de macromoléculas debido al menor costo computacional que presentan.

Los cálculos de mecánica molecular (MM) son los más utilizados en química medicinal computacional y para ello, un gran número de **campos de fuerza** han sido desarrollados en los últimos años. Los resultados de MM son altamente dependientes de la forma en que es descrita la energía potencial y de la calidad de parametrización del campo de fuerzas utilizado.

Estos métodos se basan en la suposición de que la energía total de una estructura puede ser expresada como la suma de términos, donde cada uno de ellos describe un tipo de interacción. Así, la energía de un campo de fuerza queda definida de la siguiente forma:

$$E_T = E_{en} + E_{\text{áng}} + E_{die} + E_{vdW} + E_{ele} + E_{cruz} \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde E_{en} es la energía de enlace entre dos átomos, $E_{\text{áng}}$ representa la energía que se requiere para deformar un ángulo de enlace, E_{die} es la energía torsional para la rotación en torno a un enlace, E_{vdW} y E_{ele} describen las interacciones de Van der Waals y electrostáticas respectivamente, y finalmente E_{cruz} describe el acoplamiento entre los tres primeros términos.⁴

La forma más simple de representar la energía de los enlaces químicos es mediante interacciones de tipo oscilador armónico (o resortes) utilizando la ley de Hooke:

$$E_{en} = \sum_{\text{enlaces}} \frac{1}{2} k_r (r - r_{eq})^2 \quad \text{Ec. 4.2}$$

donde r_{eq} es la distancia de enlace de equilibrio y k_r es la constante de fuerza que representa la resistencia al cambio en la longitud de enlace respecto a la distancia de equilibrio.

De un modo similar se puede definir la energía de los ángulos de enlace (θ):

$$E_{\text{áng}} = \sum_{\text{ángulos}} \frac{1}{2} k_{\theta} (\theta - \theta_{eq})^2 \quad \text{Ec. 4.3}$$

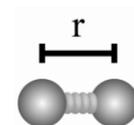


Figura 4.3. Distancia de enlace (r).

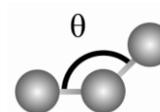


Figura 4.4. Ángulo de enlace (θ).

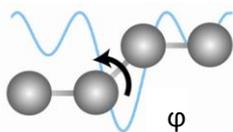


Figura 4.5.
Ángulo diedro (φ).

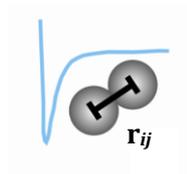


Figura 4.6.
Potencial de Lennard-Jones y distancia óptima (r).

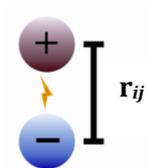


Figura 4.7.
Interacción electrostática entre partículas con carga (q) a distancia R

La energía asociada con la rotación de un ángulo diedro se puede expresar como:

$$E_{die} = \sum_{diedros} \frac{1}{2} V [1 - \cos(n\varphi + \omega)] \quad \text{Ec. 4.4}$$

donde n es la periodicidad de la rotación y V es proporcional a la barrera de rotación.

Los términos siguientes son algunas veces denominados términos de no-enlace, ya que se refieren a interacciones entre átomos no enlazados.

La mayoría de los campos de fuerza describen las interacciones de Van der Waals mediante un potencial de Lennard-Jones:

$$E_{vdw} = \sum_{i < j} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad \text{Ec. 4.5}$$

en la que los parámetros A y B son constantes específicas de los átomos involucrados y r es la distancia en la que el potencial se encuentra en un mínimo.

La energía de interacción electrostática generalmente es calculada utilizando la ley de Coulomb de la siguiente forma:

$$E_{ele} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad \text{Ec. 4.6}$$

donde q es la carga sobre cada núcleo y ϵ es la constante dieléctrica del medio.

Otra de las interacciones entre átomos no enlazados, son las interacciones de puente de hidrógeno que se describen utilizando potenciales de no-enlace específicos.^{5,6}

Entre los campos de fuerza más utilizados en la actualidad para simular proteínas se pueden mencionar: AMBER, desarrollado por la Universidad de California (1984)^{7,8} y CHARMM, desarrollado en la Universidad de Harvard (1983).⁹

4.1.2.b. Simulaciones de docking

Las simulaciones de *docking* permiten predecir la conformación y orientación preferida de un ligando cuando está unido a un receptor. Dichas simulaciones a su vez pueden ser usadas para predecir la energía de asociación (conocida también como energía de *binding*) o afinidad de enlace entre las dos moléculas, usando para ello las funciones de *scoring* (**scoring functions**).

Existen varias clases de *scoring functions*:

- aquellas que derivan de **campos de fuerza**, por lo que incluyen principalmente los términos de interacciones de no-

enlace (Van der Waals y electrostáticas) y generalmente también contienen términos de solvatación.

- **empíricas** (o basadas en regresión), las cuales se fundamentan en contar el número de distintos tipos de interacciones entre el ligando y la proteína, como ser: puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, tamaño de la superficie de contacto lipofílica, flexibilidad del ligando, potencial electrostático en el sitio activo, etc.¹⁰
- **potenciales estadísticos** (o basadas en el conocimiento), se fundamentan en el análisis estadístico de contactos intermoleculares ligando-proteína de estructuras publicadas en base de datos (*Cambridge Structural Database, Protein Data Bank*)
- otros protocolos se basan en asignar puntajes (*scores*) según la complementariedad de superficie en cuanto a forma, naturaleza hidrofílica o hidrofóbica, etc.⁶

Existen muchas herramientas de *docking* disponibles entre las que se pueden mencionar: AutoDock,¹¹ AutoDock Vina,¹² Glide,^{13,14} GOLD,¹⁵ MOE,¹⁶ PLANTS^{17,18} y rDock¹⁹ entre otros.

Como se mencionó anteriormente, el *docking* es una herramienta muy valiosa para la identificación y optimización del *lead* ya que con él se pueden establecer modelos de interacción entre el ligando y el receptor. Esta metodología también puede ser utilizada para realizar VS, que consiste en la identificación *in silico* de potenciales candidatos a drogas de una quimioteca de cientos de miles de compuestos. Las estrategias utilizadas para realizar un *screening* virtual pueden ser:

- **basado en el ligando (LBVS)**, por sus siglas en inglés: *Ligand-based virtual screening*) se fundamentan en la premisa que compuestos similares a un ligando activo son más propensos a ser activos que ligandos seleccionados al azar. Entonces, dado un set de ligandos estructuralmente diversos que se unen a un dado receptor, se puede construir un modelo farmacóforo explotando la información colectiva contenida en esos ligandos (generalmente se consideran propiedades electrostáticas, forma y puntos de interacción).²⁰

- **basado en la estructura (SBVS)**, por sus siglas en inglés: *Structure-based virtual screening*). Esta técnica aprovecha el conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína blanco, ya sea la estructura cristalográfica o modelado por homología (predicción de la estructura 3D a

partir de su secuencia de aminoácidos), y posteriormente utiliza la metodología de *docking* para predecir el modo de unión (o *binding mode*) de los ligandos dentro del sitio activo y estimar la probabilidad de que los mismos se unan a la proteína con alta afinidad. Esta información es luego empleada para seleccionar los posibles candidatos a ser evaluados mediante ensayos biológicos.

Si bien las metodologías mencionadas anteriormente permiten racionalizar el proceso de descubrimiento de drogas mediante la reducción de los costos y recursos, no hay que perder de vista que las *scoring functions* disponibles hasta el momento no son capaces de predecir eficientemente la energía de *binding* ya que las mismas utilizan diversas aproximaciones y las condiciones de simulación difieren mucho de lo que son los medios biológicos reales.²¹ Además, los programas de *docking* pueden fallar en identificar el modo de unión correcto para un dado complejo ligando-proteína, esto es, distinguir la pose cristalográfica del *set* de poses de *docking* calculadas.^{6,22} Por lo tanto, el éxito del SBVS depende de la exactitud del protocolo de *docking* usado para seleccionar los candidatos de la quimioteca.

4.1.2.c. Simulaciones de Dinámica Molecular (DM)

Los estudios cristalográficos de proteínas han demostrado que la flexibilidad de las mismas cumple un rol muy importante tanto en sus funciones como en la unión del ligando. En este sentido, las simulaciones de DM, desarrolladas por primera vez por McCammon, Gelin y Karplus en la década de 1970,²³ permitieron predecir el movimiento de las proteínas en menor tiempo, disminuyendo los costos y ofreciendo información complementaria y diferente a la obtenida a partir de rayos X.

En las simulaciones de DM se generan sucesivas configuraciones del sistema en estudio mediante la integración de las leyes de movimiento de Newton. El resultado es una trayectoria que indica como varían las posiciones y velocidades de las partículas con el tiempo.

Existen varios algoritmos que permiten integrar las ecuaciones de movimiento usando métodos diferenciales. Todos ellos asumen que las posiciones y las propiedades dinámicas (velocidades, aceleraciones, etc.) pueden ser aproximadas mediante una expansión en serie de Taylor:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \mathbf{b}(t) + \dots \text{ Ec. 4.7}$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \delta t \mathbf{a}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{b}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \mathbf{c}(t) + \dots \text{ Ec. 4.8}$$

donde \mathbf{v} es la velocidad (primera derivada de la posición respecto al tiempo); \mathbf{a} es la aceleración (segunda derivada), \mathbf{b} es la tercera derivada, etc.

Uno de los algoritmos más utilizados para integrar las ecuaciones de movimiento en una simulación de DM es el algoritmo de Verlet (1967), el cual usa las posiciones y aceleraciones a tiempo t , y las posiciones del paso previo, $\mathbf{r}(t - \delta t)$, para calcular las nuevas posiciones a $t + \delta t$, $\mathbf{r}(t + \delta t)$. Así, se pueden escribir las siguientes relaciones entre posición, velocidad y aceleración a tiempo t :

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) + \dots \text{ Ec. 4.9}$$

$$\mathbf{r}(t - \delta t) = \mathbf{r}(t) - \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) - \dots \text{ Ec. 4.10}$$

y sumando las Ec. 4.9 y 4.10 da:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2 \mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \delta t^2 \mathbf{a}(t) \text{ Ec. 4.11}$$

Las velocidades no aparecen explícitamente en el algoritmo de Verlet, pero pueden ser aproximadas dividiendo la diferencia en las posiciones a tiempo $t + \delta t$ y $t - \delta t$ por $2 \delta t$ de la siguiente forma:

$$\mathbf{v}(t) = [\mathbf{r}(t + \delta t) - \mathbf{r}(t - \delta t)] / 2 \delta t \text{ Ec. 4.12}$$

De esta manera, una vez calculadas las fuerzas actuando sobre cada átomo del sistema, las nuevas posiciones de los átomos se calculan de acuerdo a las ecuaciones descritas anteriormente (o en un modo similar dependiendo del algoritmo utilizado). El tiempo de cada paso de la simulación suele ser de 1 o 2 femtosegundos (fs) y este proceso es repetido miles de veces hasta obtener la trayectoria deseada (Figura 4.8).²⁴

Debido a la gran cantidad de cálculos que se requieren, las simulaciones de DM generalmente se realizan en *clusters* o supercomputadoras y en los últimos años se han desarrollado nuevos algoritmos y mejoras en los *hardware* de los sistemas informáticos para acelerar la velocidad de cálculo, llegando así a simular dinámicas a escala de microsegundos (sistemas de GPUs^{25,26}) y a escala de milisegundos (Anton²⁷ y MDGRAPE-4²⁸). Estos avances permitieron simular tiempos suficientemente largos como para obtener información acerca de la dinámica de proteínas

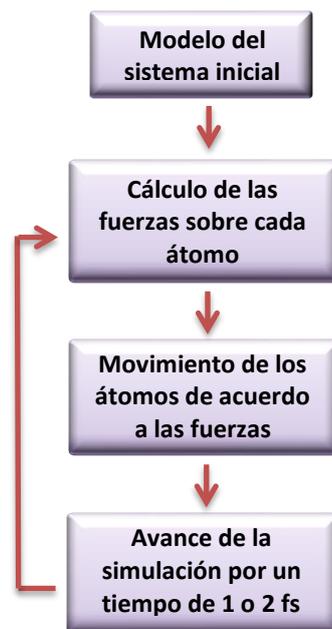


Figura 4.8. Funcionamiento de una simulación de DM.

y procesos biológicos (como reconocimiento molecular y la unión de un ligando a un determinado receptor) que no pueden ser observados experimentalmente y que solo pueden ser estudiados mediante simulaciones de DM.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que las aplicaciones de la DM jugarán un papel importante en el entendimiento de la biología molecular, la biofísica y la química farmacéutica en un futuro.^{29,30,31}

4.1.3. Inhibición de la quinasa *Checkpoint 1* (Chk1) para el tratamiento del cáncer

A diferencia de las quimioterapias regulares las cuales actúan destruyendo las células tumorales con escasa selectividad, las terapias dirigidas contra el cáncer son fármacos u otras sustancias que se diseñan deliberadamente para que actúen en blancos moleculares específicos que están asociados con el crecimiento, el avance y la diseminación de las células tumorales.

Las terapias dirigidas incluyen inhibidores de transducción de señales, moduladores de la expresión de genes, terapias hormonales, inhibidores de la angiogénesis, inmunoterapias e inductores de apoptosis entre otras.³² Dentro de los inductores de la apoptosis existen varias drogas que actúan sobre diversas proteínas que interfieren en el ciclo celular. Una de las proteínas que ha sido de gran interés en los últimos años para el desarrollo de fármacos anticancerígenos es la quinasa *Checkpoint 1* (Chk1).

4.1.3.a. Función y regulación de la Chk1

Los puntos de control o *checkpoints* del ciclo celular están controlados por dos quinasas: ATM (*ataxia-telangiectasia mutated kinase*) y ATR (*ATM- and Rad3-related*), quienes activan a Chk2 y Chk1 respectivamente.

La *vía* ATR-Chk1 detecta un amplio espectro de anomalías en el ADN (daños por luz UV, inhibición de la replicación, ruptura de la doble hélice, etc.); cuando esto sucede, ATR induce la activación de Chk1 mediante la fosforilación en Ser317 y Ser345. Posteriormente Chk1 se autofosforila en Ser296 favoreciendo así, la interacción con cualquiera de las isoformas de Cdc25. En particular, cuando Chk1 fosforila a Cdc25C en Ser216, se produce el anclaje a la proteína 14-3-3, quienes finalmente inactivan al complejo CDK/Ciclina promoviendo el arresto del ciclo celular en fase G2 (Figura 4.9). Por su parte, la *vía* ATM-Chk2 produce el

arresto del ciclo celular en fase G1 mediante la proteína supresora de tumores p53 (Figura 4.9).³³

Sin embargo, en el 50-70 % de las células cancerígenas, esta última *vía* se ve disminuida debido a la supresión o mutaciones de p53, siendo estas mutaciones las que están involucradas en el desarrollo y progresión del cáncer. Este defecto fue utilizado como una estrategia para el desarrollo de fármacos dirigidos. Así es entonces como surgieron los inhibidores de Chk1, los cuales pueden conducir a la apoptosis de las células cancerígenas, mientras que las células normales quedarían arrestadas en la fase G1 por la acción de p53 (Figura 4.10). Es decir, los inhibidores de Chk1 actúan potenciando la eficacia de los agentes que dañan al ADN utilizados en terapias oncogénicas, y es por esto que se consideran un atractivo blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer.³⁴⁻³⁶

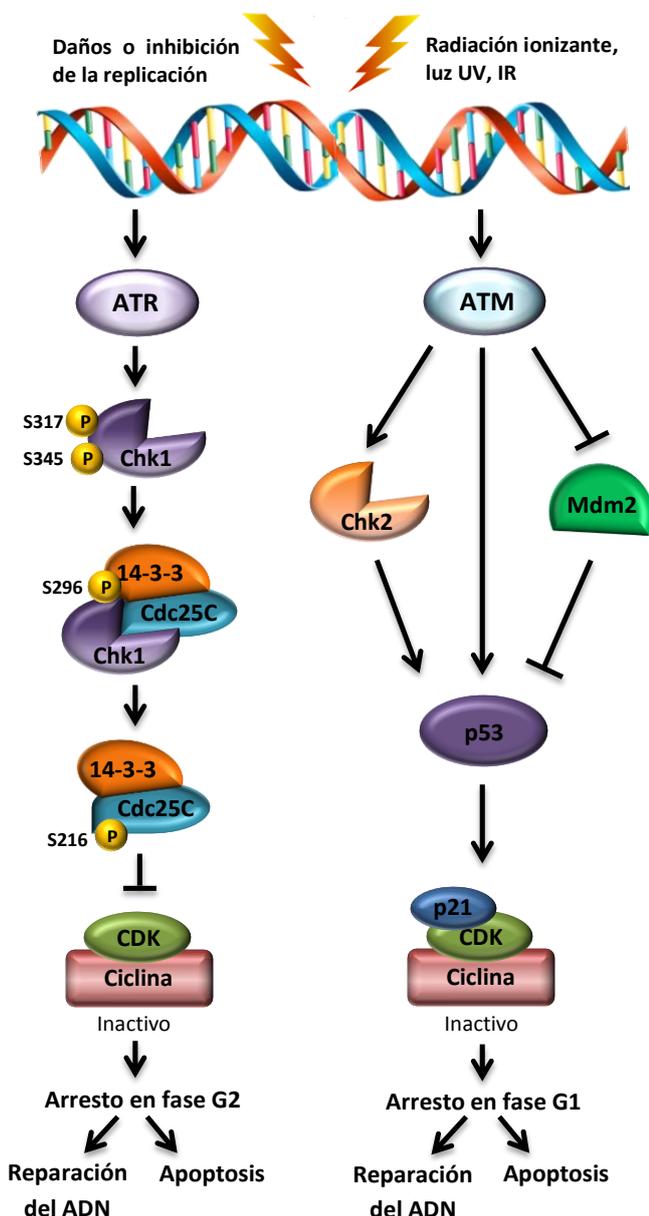
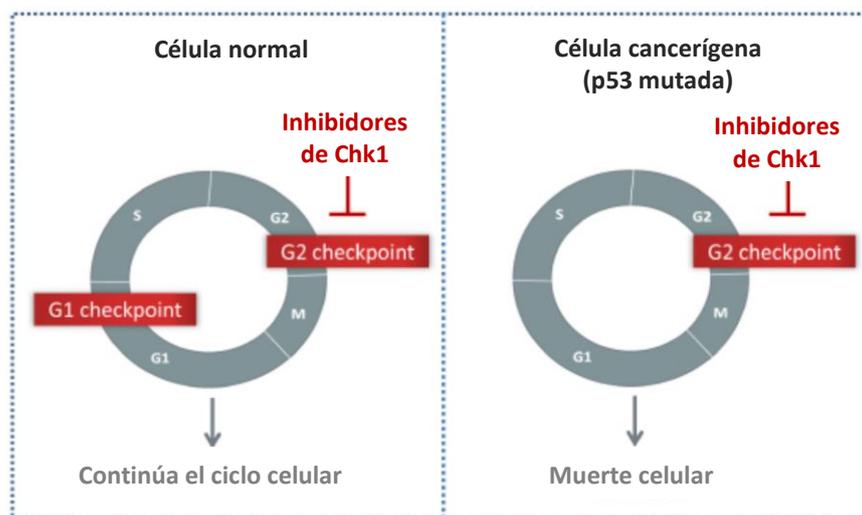


Figura 4.9.

Esquema de activación de los *checkpoints* del ciclo celular en respuesta a los daños del ADN.

Figura 4.10.

Comparación del funcionamiento de una célula normal y una cancerígena frente a inhibidores de Chk1.



4.1.3.b. Estructura de la Chk1

La Chk1 es una serina/treonina quinasa de 476 aminoácidos que contiene un dominio N-terminal altamente conservado (residuos 1-265), un *linker* flexible y una región C-terminal menos conservada y con una función aun indefinida. De hecho, se ha demostrado que la Chk1 cristalizada (código PDB: 1IA8, residuos 1-289) es 20 veces más activa hacia varios sustratos, que la proteína recombinante completa; motivo por el que probablemente solo se recrystalice este dominio de la proteína.³⁷

Muchas proteínas sufren cambios conformacionales cuando su ligando endógeno o sustrato se une a la misma, sin embargo, en la Chk1 no se han observado cambios conformacionales entre la apoenzima y el complejo Chk1/AMP-PNP (adenilil imidodifosfato, análogo estructural no hidrolizable del ATP). En ambas estructuras el sitio de unión del ATP, los residuos catalíticos y el *loop* de activación están bien ordenados.³⁷ Por su parte, la unión de ligandos exógenos (ej.: inhibidores) producen cambios insignificantes en la conformación de la proteína.³⁸

Se sabe que la fosforilación de Chk1 en Ser317 y Ser345 es indispensable para su función. Sin embargo, aún no se conoce exactamente cómo dicha fosforilación activa a Chk1, ya que el estudio cristalográfico de su estructura reveló que en ausencia de fosforilación, la Chk1 asume una conformación activa. Su *loop* de activación (mostrado en rojo en la Figura 4.11) se encuentra en una zona de residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína y aparentemente está estabilizado por la estructura secundaria y la interacción de las cadenas laterales.³⁷

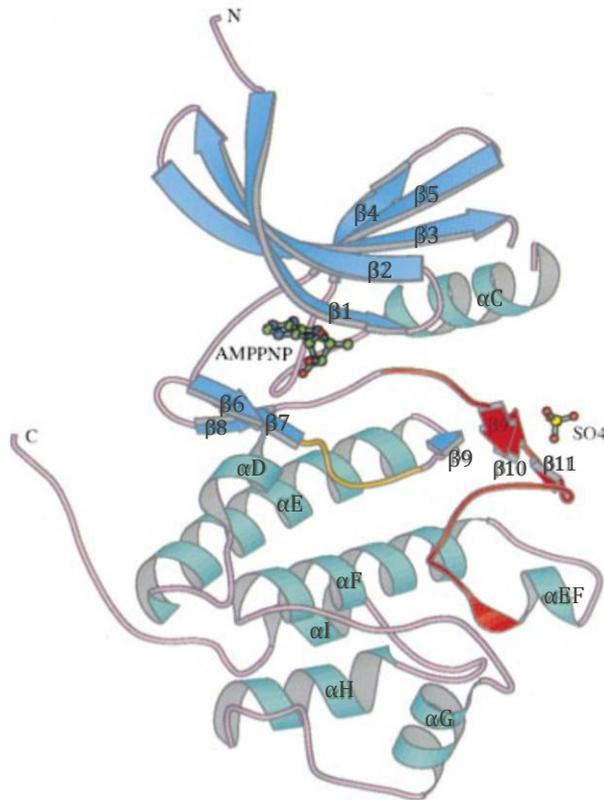


Figura 4.11.

Estructura secundaria del complejo Chk1 con AMP-PNP. Las α -hélices se muestran en celeste, las láminas β en azul, el *loop* de activación en rojo y el *loop* catalítico en color amarillo. Figura extraída de ref. 37

En el sitio catalítico (mostrado en color amarillo en la Figura 4.11) es donde se produce la fosforilación de la Cdc25C en la Ser216. El modelo de interacción entre la Chk1 y el péptido Leu-Tyr-Arg-Ser-Pro-Ser-Met-Pro-Glu (residuos 211-219) de la Cdc25C se muestra en la Figura 4.12. Mediante este modelo se ha demostrado que la fosforilación es muy selectiva, ya que es el átomo de O γ de la Ser(P) el que actúa como nucleófilo en la reacción de transferencia de fosfato, mientras que la Ser(P-2) no es fosforilada.³⁷

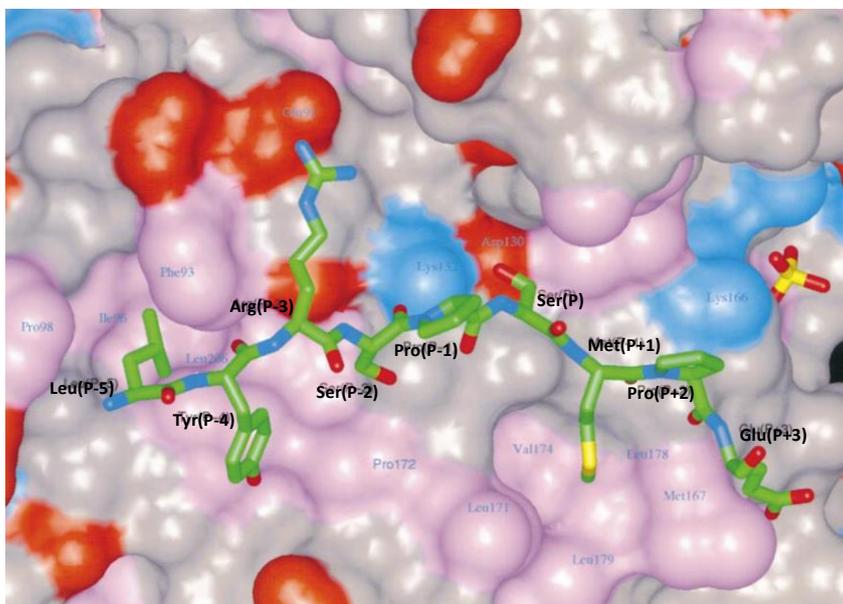


Figura 4.12.

Modelo de interacción entre la Chk1 y el péptido de Cdc25C. Los residuos básicos de la superficie de Chk1 se muestran en azul, los ácidos en rojo y los no polares en violeta, mientras que el péptido está coloreado según: C (verde), N (azul), O (rojo) y S (amarillo). Figura extraída de ref. 37.

Mediante estudios de mutaciones se demostró que la Thr170 ayuda a posicionar el carbonilo del residuo catalítico Asp130, ya que una mutación en Thr170 por Ala o Glu inhibe la actividad de la quinasa hacia la fosforilación de Ser216 en la Cdc25C, mientras que la mutación de Tyr20 por Glu o Phe no afecta significativamente su actividad.³⁷

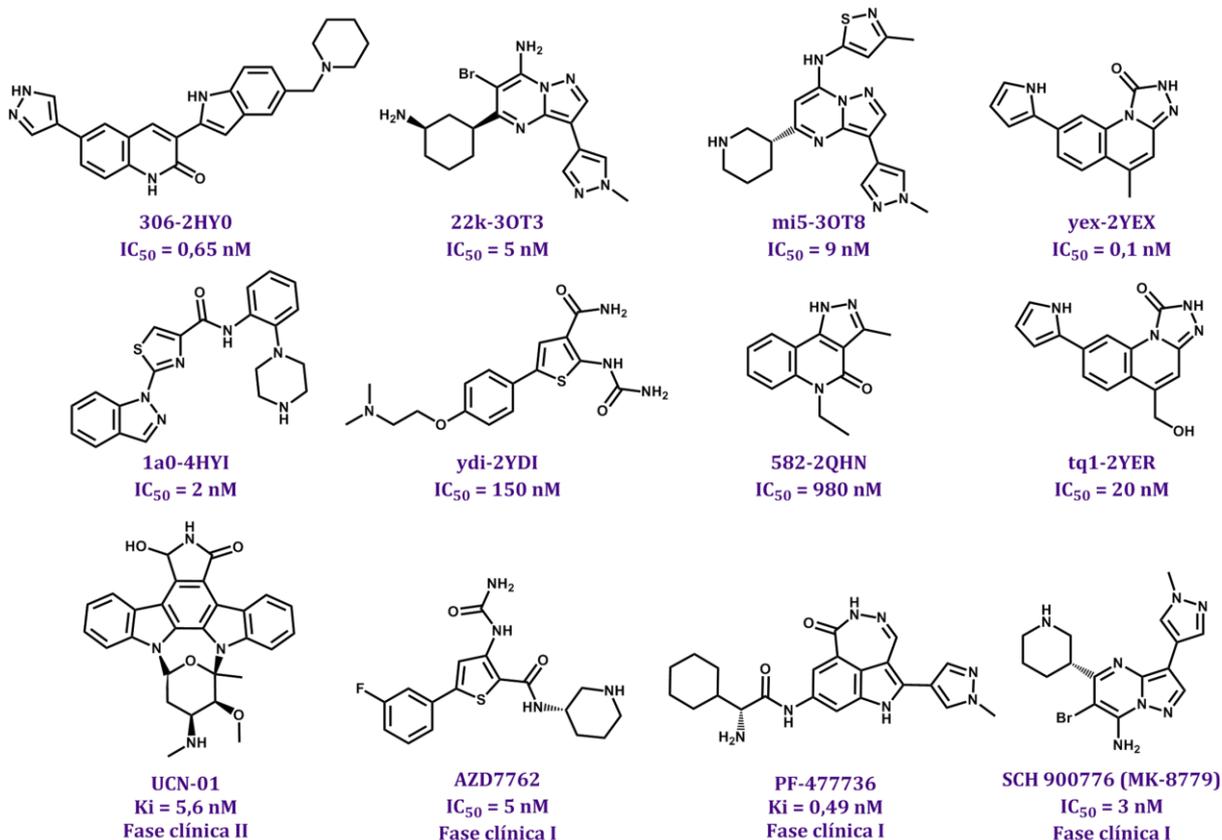
4.1.3.c. Inhibidores de referencia de la Chk1

Si bien la mayoría de los inhibidores reportados hasta el momento son competitivos con el ATP, esta estrategia presenta algunas desventajas: una de ellas es la baja selectividad ya que la gran mayoría de las quinasas en el cuerpo humano tienen el sitio de unión del ATP altamente conservado y además, estos inhibidores deben unirse fuertemente al sitio activo para superar la alta concentración fisiológica del ATP. Tal motivo llevó al desarrollo de inhibidores que se unen fuera del sitio del ATP (sitios alostéricos) debido a la gran divergencia de estos sitios entre las diferentes quinasas.³⁹

A lo largo de estos años se han desarrollado inhibidores muy potentes de la Chk1 que se unen al mismo sitio de unión del ATP, algunos de los cuales se muestran en la Figura 4.13.a. Entre ellos, cabe destacar el compuesto UCN-01 que fue el primer inhibidor de Chk1 derivado de Staurosporina y que ha sido evaluado en ensayos clínicos de fase I y II, frente a diversos tipos de cáncer.^{38,40-42} Además de UCN-01 existen otros inhibidores, desarrollados por empresas farmacéuticas, que han sido sometidos a ensayos clínicos de fase I donde AZD7762 (Astra Zeneca),⁴³ PF-477736 (Pfizer)³⁵ y SCH900776 (Schering Plough/Merck) son algunos de los más conocidos.^{44,45} Desafortunadamente, hasta el momento, ninguno de ellos ha progresado a fases de evaluación más avanzadas debido en parte a la baja selectividad y a la aparición de efectos secundarios.^{46,47}

Todos los inhibidores que se unen al sitio del ATP lo hacen de un modo similar y las principales interacciones que presentan con los residuos de sitio activo son interacciones de Van der Waals con Leu15, Tyr20, Val23, Ala36, Lys38, Leu84, Tyr86 y Leu137, y puentes de hidrógeno con Glu85 y Cys87. Este patrón de interacciones de puente de hidrógeno es común en muchos complejos de quinasas con ATP³⁸ y en complejos de inhibidores muy potentes con la Chk1.^{48,49}

a) Inhibidores del sitio de unión del ATP



b) Inhibidores alostéricos

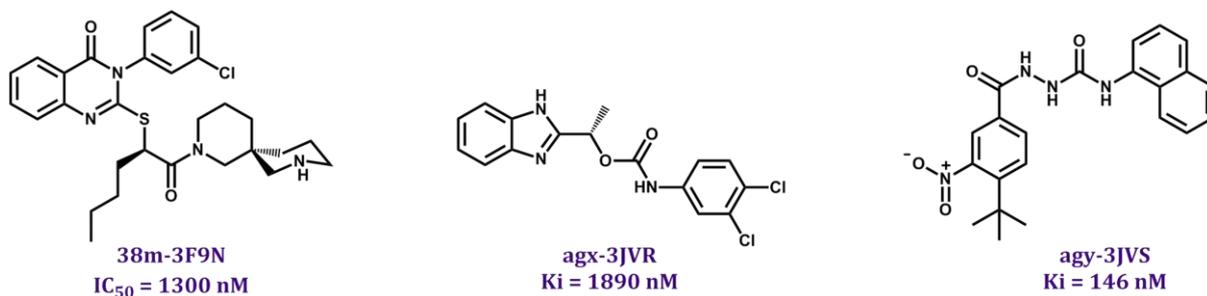


Figura 4.13. Estructuras de inhibidores de la Chk1. **a)** Inhibidores competitivos con el ATP. **b)** Inhibidores no competitivos o alostéricos.

Según el modelo de farmacóforo propuesto por Kumar y colaboradores, en el que se incluyeron dos moléculas de agua cristalográfica para la construcción del mismo, la molécula debería contener al menos: dos aceptores de puente de hidrógeno, un donador de puente de hidrógeno y un anillo aromático.⁵⁰ Mientras que, según Ambre y colaboradores, el modelo de farmacóforo está caracterizado por un aceptor de puente de hidrógeno, un donador de puente de hidrógeno y dos grupos hidrofóbicos.⁵¹

En el año 2009 se descubrió un sitio alostérico en la Chk1, y el único reportado hasta el momento, que abrió las puertas

al diseño de inhibidores más selectivos y no competitivos con el ATP.^{52,53} Este bolsillo hidrofóbico formado por Phe93, Pro133, Leu206 y Ala200 se encuentra en el dominio C-terminal adyacente a la hélice α D, muy cercano al sitio de *binding* del sustrato Cdc25 (Figura 4.11).

A pesar de las ventajas que podrían tener los inhibidores alostéricos, actualmente se conocen muy pocos compuestos de este tipo; entre ellos se destacan la familia de tioquinazolinonas (38m-3F9N),⁵² el carbamato (agx-3JVR) y la hidrazida (agy-3JVS)⁵³ de la Figura 4.13.b, los cuales fueron menos potentes comparados con los inhibidores del sitio activo.

En la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos para terapias oncogénicas, se propuso entonces evaluar las pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas sintetizadas (PQ, Capítulo 3) como posibles inhibidores de Chk1 debido a la similitud estructural de estos compuestos con los núcleos heterocíclicos de algunos inhibidores de referencia mostrados en la Figura 4.13.

4.2.

Objetivos específicos

Los objetivos planteados en este capítulo fueron:

- Seleccionar el mejor protocolo de *docking*, esto es, la mejor combinación programa de *docking/scoring function*, además de la estructura cristalizada de la proteína Chk1 más adecuada para realizar las simulaciones.
- Realizar simulaciones de *docking* de las pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas sintetizadas, además de posibles estructuras a sintetizar, en el sitio activo de la Chk1.
- Analizar las principales interacciones de los ligandos con los residuos del sitio activo del receptor, y seleccionar los mejores candidatos para posteriores análisis.
- Realizar simulaciones de DM de las pirazoloquinolinonas seleccionadas en el sitio activo de la Chk1, utilizando la metodología clásica, y emplear DM supervisada (SuMD) para estudiar el proceso de reconocimiento droga-receptor hasta su localización en el sitio activo.
- Realizar ensayos *in vitro* de actividad inhibitoria en la quinasa Chk1 de las pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas seleccionadas.
- Realizar un análisis comparativo de los resultados experimentales de actividad inhibitoria con las simulaciones computacionales.

4.3.1. Resultados preliminares con *Autodock 4.0*

Para tener una primera aproximación del modo de ligado de las pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas en el sitio de unión del ATP en la quinasa Chk1 se realizaron simulaciones de *docking* con *Autodock 4.0* de la quimioteca mostrada en la Figura 4.14, utilizando la estructura cristalográfica de código PDB: 1ZLT. De aquí en adelante las estructuras de pirazoloquinolinonas utilizadas en el estudio de *docking* serán llamadas **PQd**, mientras que **PQ** hará referencia a las provenientes de la síntesis.

En líneas generales se observó que las conformaciones (o poses) de las **PQd** generadas por *Autodock* se orientaron en tres modos diferentes, siendo el que se muestra en la Figura 4.15 el más poblado ya que es aquel que permite la interacción de puente de hidrógeno con la Cys87. Además se observó que las **PQd** con $R_2 = OCH_3$ forman un puente de hidrógeno adicional con Lys38 (Figura 4.15.b). En la Figura 4.15.a se muestran las interacciones de Van der Waals con los residuos más importantes del sitio activo mencionados previamente en la Sección 4.1.3.c.

Mediante el análisis del potencial electrostático se observó una buena complementariedad de cargas entre la proteína y el ligando **PQd** (Figura 4.16). La densidad de carga

4.3.

Simulaciones de *docking* de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas en la Chk1

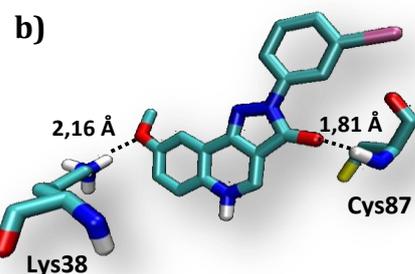
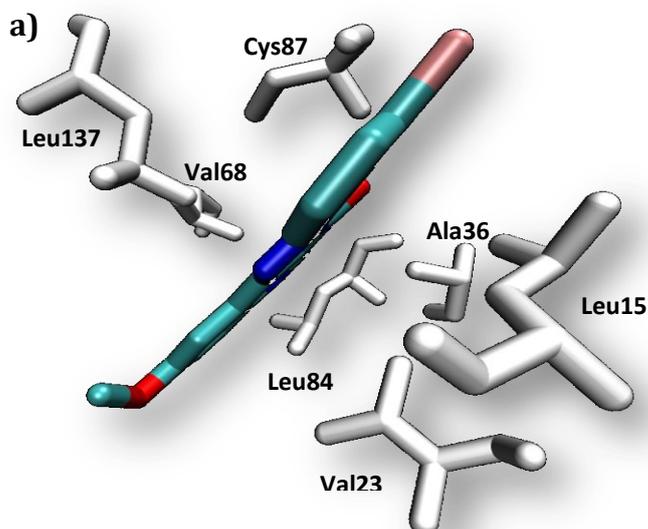
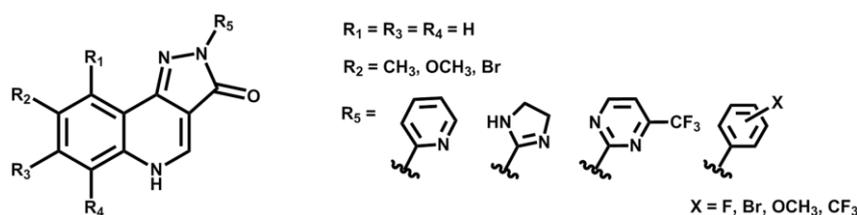


Figura 4.14.

Estructuras de pirazoloquinolinonas utilizadas para el *docking* (**PQd**) en el sitio activo de Chk1.

Figura 4.15.

a) Interacciones de Van der Waals con residuos no polares del sitio activo de la Chk1.
b) Puentes de hidrógeno con Lys38 y Cys87.

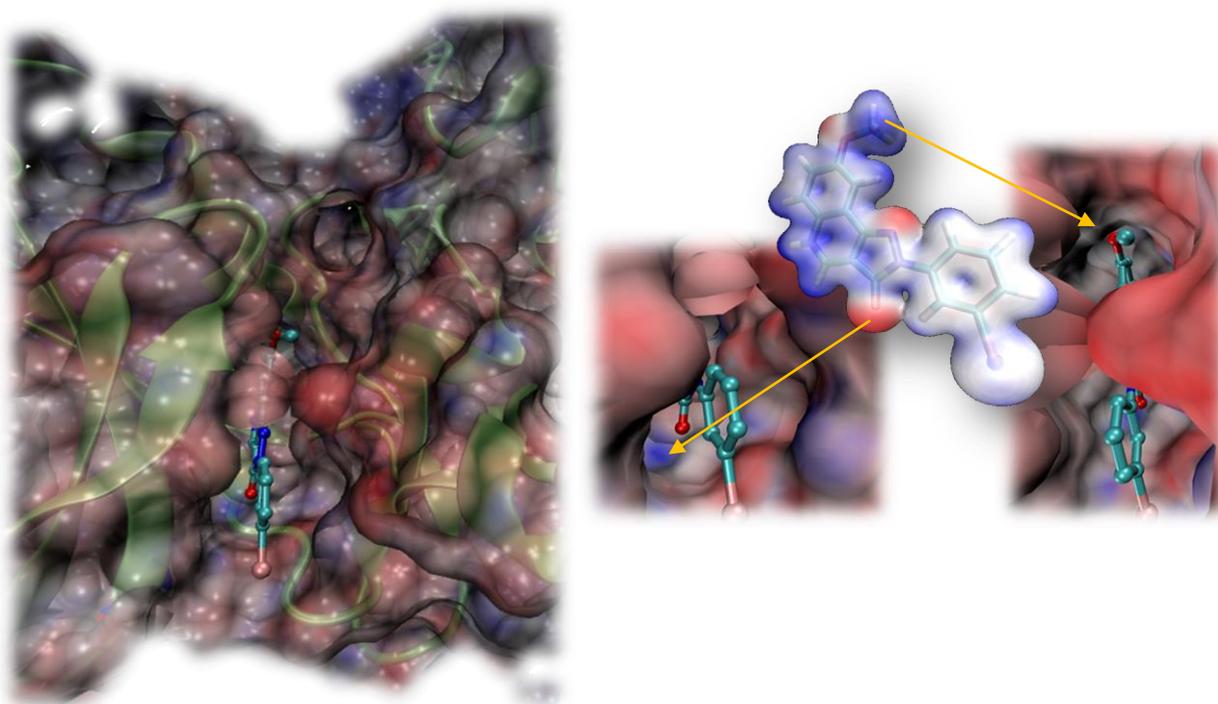


Figura 4.16. Potencial electrostático de la proteína (izquierda) y ampliación de las interacciones electrostáticas entre **PQd** y los residuos del sitio activo (derecha). Referencia de colores: rojo = valores negativos y azul = valores positivos.

negativa generada por el grupo carbonilo del anillo de pirazolona complementa con una zona de potencial electrostático positivo, mientras que el grupo $R_2 = OCH_3$ se polariza debido a la presencia del oxígeno electronegativo dejando el metilo con una densidad de carga parcial positiva la cual se complementa en una zona de potencial electrostático negativo en la Chk1 (Figura 4.16).

4.3.2. *DockBench 1.0*: plataforma informática para la validación de protocolos de *docking* y desarrollo de *virtual screening*

Como se describió en la Sección 4.1.2.b, el VS es una estrategia que permite seleccionar posibles candidatos a drogas de una quimioteca de miles de compuestos. En particular, el SBVS explota el conocimiento de la estructura 3D del receptor y realiza el *docking* de los compuestos para seleccionar los candidatos en base a la afinidad o complementariedad por el sitio de unión. En este punto, es importante recordar que los programas de *docking* pueden fallar en identificar el modo de unión correcto para un dado complejo ligando-proteína, esto es, distinguir la pose cristalográfica del *set* de poses de *docking* calculadas.^{6,22} Por lo tanto, un paso crucial en la configuración de los

experimentos de SBVS es la selección del protocolo de *docking* más apropiado; es decir, la combinación del algoritmo de búsqueda y *scoring function* que permita alcanzar la mayor precisión posible.

La comparación de los protocolos de *docking* no es una tarea trivial, además, la preparación de los archivos de configuración (*inputs*), la extracción de los resultados de cada archivo de salida (*output*) y finalmente la comparación de los resultados demandan varios meses de trabajo. Dentro de este marco y basándose en el antecedente previo de Ciancetta y colaboradores,⁵⁴ se propuso automatizar el proceso de selección del mejor protocolo mediante estudio comparativo (*benchmark*). Así es como surgió la creación de **DockBench 1.0**:⁵⁵ una plataforma informática (disponible sin cargo en <http://mms.dsfarm.unipd.it/mmsdockbench.html>) que permite automatizar el procedimiento completo, desde la validación del protocolo de *docking* hasta el desarrollo de VS. Este trabajo fue desarrollado durante una estadía de investigación de seis meses en el grupo del Prof. Stefano Moro (*Molecular Modeling Section*) de la Università degli Studi di Padova (Italia).

El esquema de funcionamiento de *DockBench 1.0* se muestra en la Figura 4.17, y una descripción completa de esta herramienta se encuentra en el trabajo desarrollado por Cuzzolin y colaboradores.⁵⁵

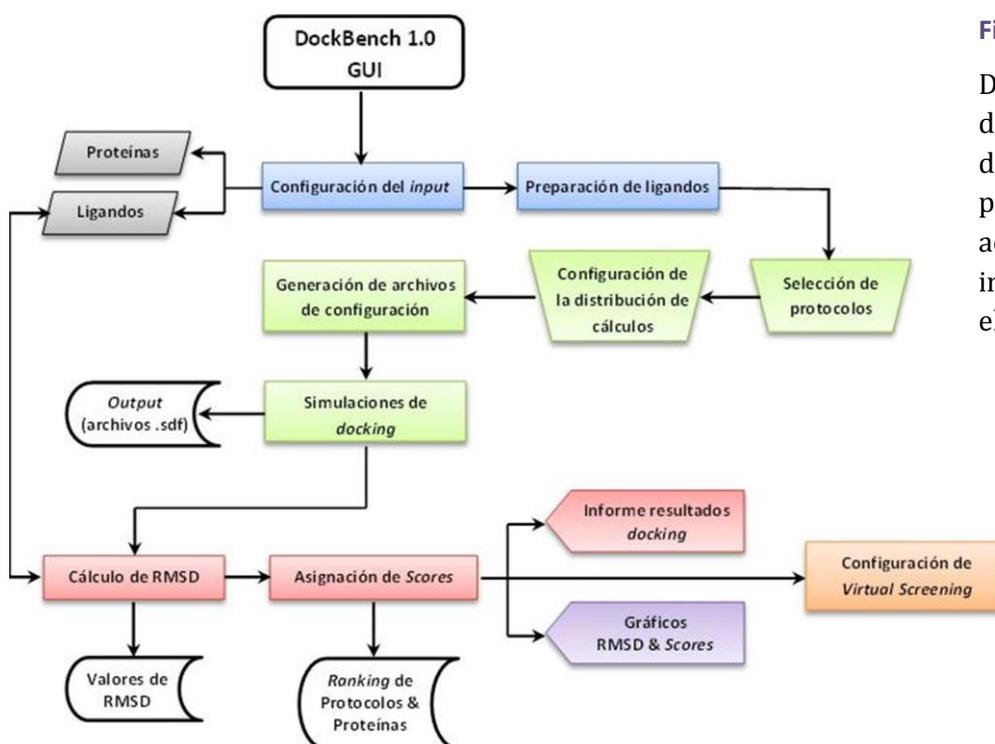


Figura 4.17.

Diagrama de flujo del funcionamiento de *DockBench 1.0*. La plataforma tiene un acceso mediante una interfaz gráfica para el usuario (GUI).

Esta herramienta permite la evaluación de 17 protocolos de *docking* diferentes utilizando la combinación de programas/ algoritmo de búsqueda/ *scoring function* mostrada en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Lista de protocolos de *docking* disponibles en *DockBench 1.0*.

Programa	Algoritmo de búsqueda/método	<i>Scoring function</i>	Abreviatura del protocolo
Autodock 4.2	Local Search	AutoDock SF	AUTODOCK-ls
	Lamarckian GA	AutoDock SF	AUTODOCK-lga
	Genetic Algorithm	AutoDock SF	AUTODOCK-ga
Autodock Vina 1.1.2	Monte Carlo + BFGS local search	Standard Vina SF	VINA-std
Glide 6.5	Glide Algorithm	Standard Precision	GLIDE-sp
GOLD 5.2	Genetic Algorithm	Goldscore	GOLD-goldscore
	Genetic Algorithm	Chemscore	GOLD-chemscore
	Genetic Algorithm	ASP	GOLD-asp
	Genetic Algorithm	PLP	GOLD-plp
MOE 2014.09	Triangle Matcher	London-dG	MOE-londondg
	Triangle Matcher	Affinity-dG	MOE-affinitydg
	Triangle Matcher	GBIWIWSA	MOE-gbiviwsa
PLANTS 1.2	ACO Algorithm	PLP	PLANTS-plp
	ACO Algorithm	PLP95	PLANTS-plp95
	ACO Algorithm	ChemPLP	PLANTS-chemplp
rDock 2013.1	Genetic Algorithm + Monte Carlo + Simplex minimization	Standard rDock master SF	RDOCK-std
	Genetic Algorithm + Monte Carlo + Simplex minimization	Standard rDock master SF + desolvation potential	RDOCK-solv

Para comparar el rendimiento de los diferentes protocolos evaluados, *DockBench 1.0* utiliza los criterios propuestos por Ciancetta y colaboradores,⁵⁴ los cuales se basan en la combinación de ciertos parámetros en un único valor estadístico llamado “*Score*”. Este último se define de la siguiente manera: a) se asigna un punto a cada protocolo que tiene un valor de RMSD promedio ($RMSD_{ave}$) menor a la resolución (R) del cristal; b) se asigna también un punto a cada protocolo que genera como mínimo 10 conformaciones con un RMSD menor a R ($N^{(RMSD < R)}$); c) se asignan dos puntos a los protocolos que satisfacen ambos requerimientos

mencionados. Finalmente, para definir cuál es el mejor protocolo entre varios que han tenido un buen rendimiento, se asignan tres puntos a aquel protocolo que tiene el menor $RMSD_{ave}$, y al mismo tiempo, genera el mayor número de conformeros con un $RMSD < R$ (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Criterios para la asignación de *Scores*

Condición	Score
$RMSD_{ave} < R$	1
$N(RMSD < R) > 10$	1
$RMSD_{ave} < R$ y $N(RMSD < R) > 10$	2
$Min(RMSD_{ave})$ y $Max(N(RMSD < R))$	3

Al finalizar las simulaciones de *docking*, *DockBench 1.0* convierte todos los *outputs* desde formato específico de cada programa a formato *structure-data files* (.sdf). Luego, para cada par estructura cristalográfica-protocolo de *docking* calcula el RMSD mínimo ($RMSD_{min}$), máximo ($RMSD_{max}$) y promedio ($RMSD_{ave}$) con respecto al modo de ligado cristalográfico. Estos valores son utilizados para calcular $N(RMSD < R)$ y el *Score* de cada protocolo, los cuales se resumen en un archivo de texto y son automáticamente graficados en mapas con escala colorimétrica para su fácil análisis e interpretación (como se muestra en la Figura 4.18).

Esta valiosa herramienta fue utilizada luego para seleccionar el protocolo de *docking* más preciso para el sistema Chk1-inhibidor. Para ello, se evaluaron todos los protocolos disponibles (Tabla 4.1) sobre 20 estructuras cristalográficas de la Chk1 en complejo con inhibidores competitivos con el ATP (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Estructuras y código PDB de los ligandos estudiados.

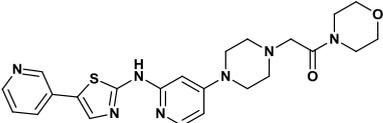
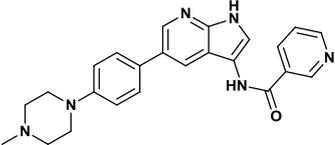
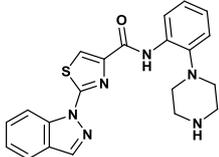
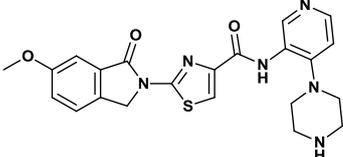
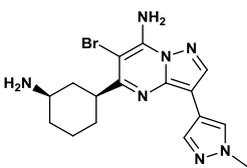
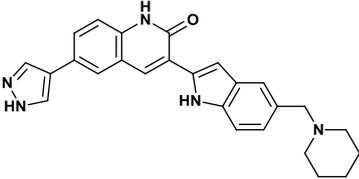
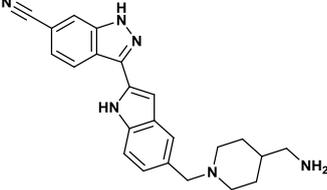
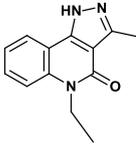
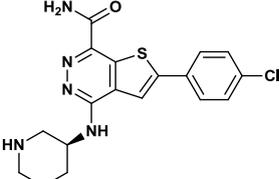
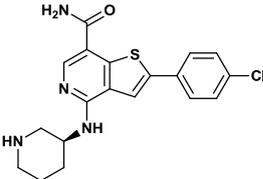
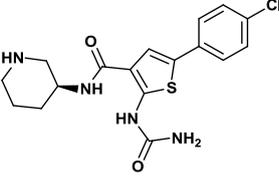
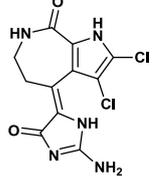
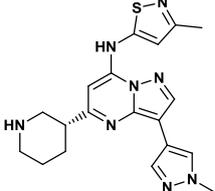
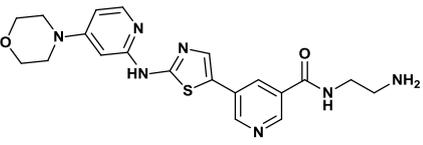
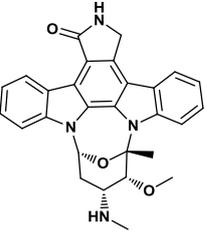
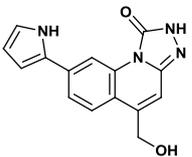
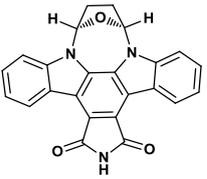
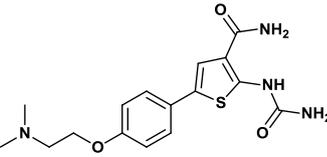
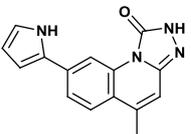
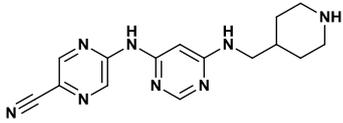
Estructura	ligando-PDB	Estructura	ligando-PDB
	07s-3TKH		199-1ZYS
	1a0-4HYI		1am-4HYH

Tabla 4.3. Continuación

Estructura	ligando-PDB	Estructura	ligando-PDB
	22k-30T3		306-2HY0
	422-2HXL		582-2QHN
	c70-3PA3		c72-3PA4
	c73-3PA5		hym-1ZLT
	mi5-30T8		s25-3TKI
	stu-1NVR		tq1-2YER
	ucm-1NVS		ydi-2YDI
	Yex-2YEX		ym7-2YM7

Los resultados arrojados por *DockBench* 1.0 son los que se muestran en la Figura 4.18.

Mediante el análisis del $RMSD_{min}$ se observa, en líneas generales, que los protocolos como VINA-std, GOLD-plp, GOLD-goldscore, GOLD-asp y AUTODOCK-ga generaron al menos una pose que reprodujo el modo de unión cristalográfico (Figura 4.18.a). Sin embargo, algunos de estos protocolos empeoran su performance cuando se analizan los valores de $RMSD_{ave}$ (Figura 4.18.b). Tal es el caso de GOLD-asp, el cual reprodujo con precisión al menos una pose cristalográfica para una dada estructura, por ejemplo c73-3PA5, pero su valor de $RMSD_{ave}$ está por encima de la resolución. Analizando los datos en términos de $N(RMSD < R)$ se desprende que, existen pocos protocolos capaces de generar

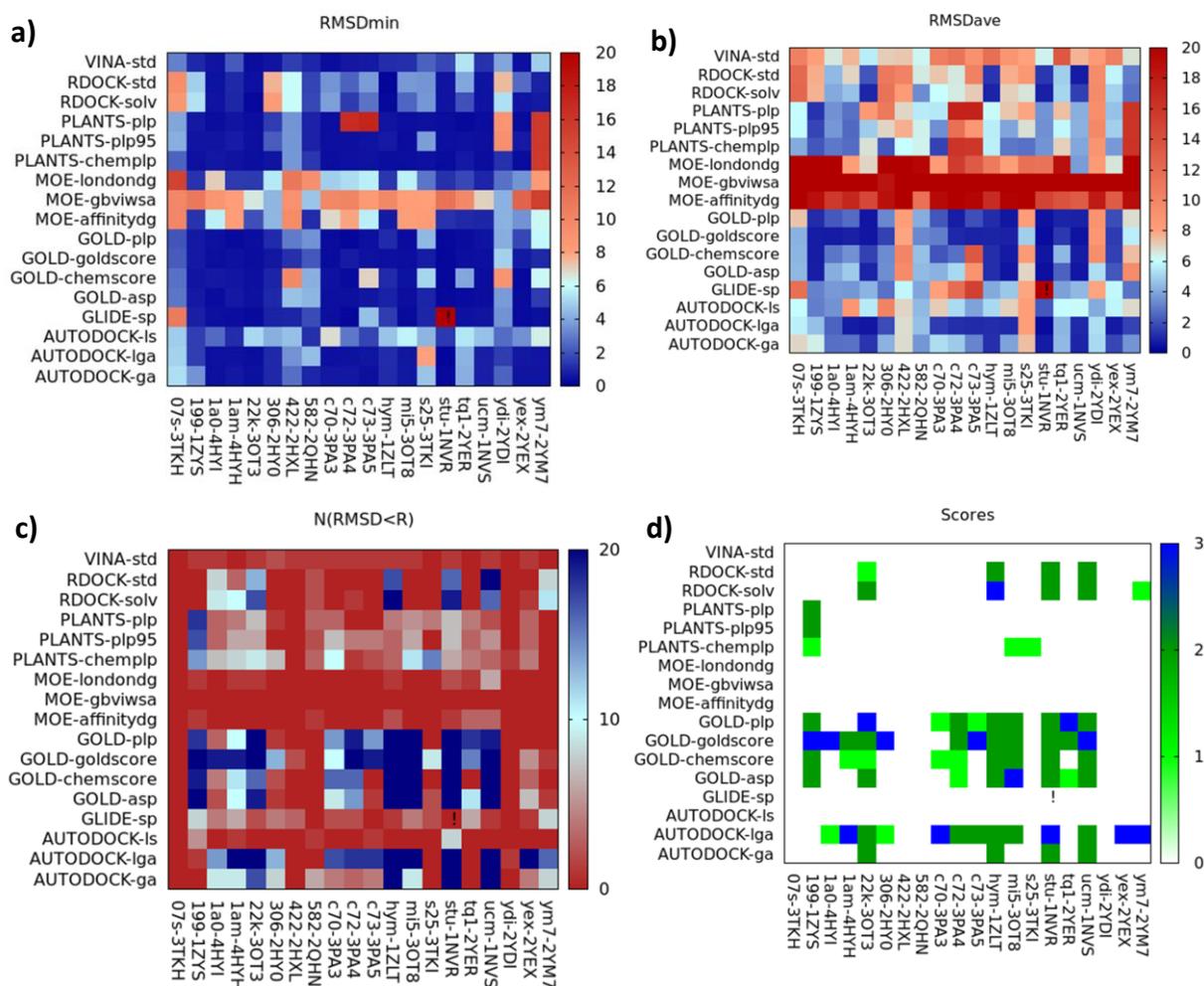


Figura 4.18. Resultados obtenidos utilizando *DockBench* 1.0 en la quinasa Chk1. **a)** Valores de $RMSD_{min}$ arrojados por el protocolo de *docking* (valores de *y*) para la estructura cristalográfica considerada (valores de *x*). **b)** Valores de $RMSD_{ave}$. **c)** Número de conformaciones obtenidas para cada protocolo que presentan un $RMSD$ menor que la resolución ($N(RMSD < R)$). **d)** *Score* de cada protocolo. Los valores de $RMSD$ están expresados en Å, mientras que el *Score* está expresado en una escala de 0-3 puntos. El signo de exclamación (!) advierte que ocurrió un error durante el cálculo de *docking*.

valores altos de $N^{(RMSD < R)}$ y que solo en el 10 % de los casos examinados (32/340) todas las conformaciones generadas por el protocolo presentaron un valor de RMSD menor que la resolución, es decir $N^{(RMSD < R)} = 20$, (Figura 4.18.c). Finalmente, los resultados de *Scores* (Figura 4.18.d) revelaron que algunos protocolos como: RDOCK-solv, GOLD-plp, GOLD-goldscore, GOLD-asp y AUTODOCK-lga, generaron el mayor *Score* para al menos un complejo ligando-proteína, sugiriendo que no existe un único protocolo de *docking* preciso, sino que la selección del protocolo adecuado para el posterior estudio de *docking* dependerá también de la proteína seleccionada. Por ejemplo, GOLD-goldscore podría ser usado con las estructuras de proteínas con código PDB 1ZYS y 1NVS, mientras que AUTODOCK-lga podría ser utilizado con la estructura 1NVR.

Por último, cabe destacar que AUTODOCK-lga y GOLD-goldscore fueron los protocolos que generaron los *Scores* más altos para un mayor número de complejos ligando-proteína diferentes.

4.3.3. *Docking* de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas con GOLD 5.2

En base a los resultados arrojados por *DockBench* 1.0, se decidió realizar el estudio de *docking* en el sitio activo de la Chk1 utilizando el protocolo GOLD-goldscore junto con la estructura cristalográfica 1ZYS.

En este caso, la quimioteca de **PQd** estudiada fue ampliada respecto a la utilizada previamente con Autodock 4.0, incorporándose nuevos sustituyentes en R₁-R₄ (Figura 4.19). Si bien, según cálculos realizados a nivel M06-2X/6-311++G(d,p) en medio acuoso, el tautómero ceto 1 (Figura 4.19) es el predominante,⁵⁶ en un medio biológico no puede asegurarse lo mismo. En un sistema biológico estos equilibrios se ven afectados principalmente por el pH y la polaridad del medio; además, es esencial considerar factores cinéticos y termodinámicos.⁵⁷ Por ende, para este estudio también se tuvieron en cuenta las tres formas tautoméricas en las que pueden encontrarse estos compuestos.

Debido al volumen de información obtenida a partir de las simulaciones de *docking*, se debió aplicar una serie de filtros basados principalmente en las interacciones (E_{vdw} , E_{ele} , interacciones hidrofóbicas y de puente de hidrógeno) de los ligandos con los residuos del sitio activo de la proteína,

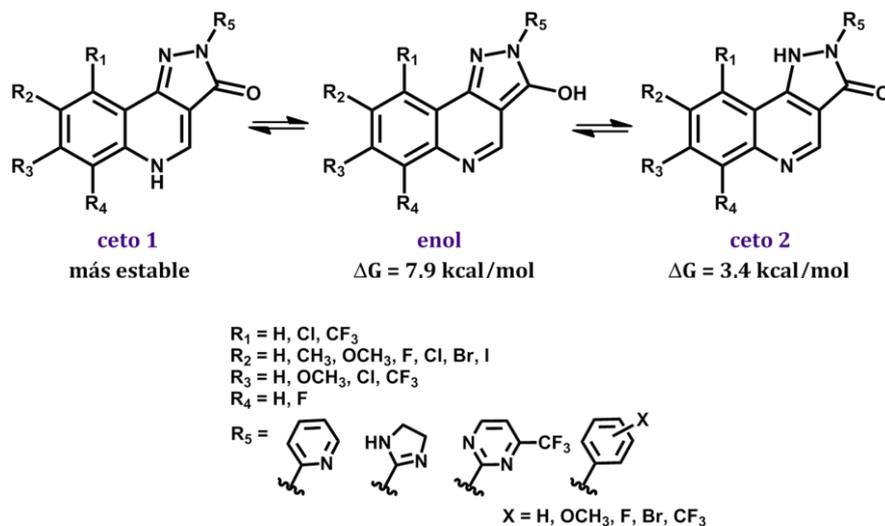


Figura 4.19.

Estructuras de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas utilizadas en las simulaciones de *docking* con GOLD 5.2. Se muestran las diferencias en energías de Gibbs para los tautómeros del compuesto con $R_1=R_3=R_4=\text{H}$, $R_2=\text{CH}_3$, $R_5=\text{Ph}$.

con el objetivo de reducir la quimioteca a un número apropiado de estructuras para ser analizado en detalle y, posteriormente seleccionar no solo los mejores candidatos sino también la conformación del mismo con mayor afinidad por el sitio de *binding*.

Uno de los filtros utilizados se muestra, a modo de ejemplo, en los gráficos de la Figura 4.20. En ellos pueden observarse las interacciones electrostáticas (Figura 4.20.a) e hidrofóbicas (Figura 4.20.b) de los ligandos con cada uno de los residuos de la proteína. Cabe aclarar que, por cuestiones de simplicidad, para el análisis se incluyeron cuarenta ligandos por cada gráfico (aquí solo se muestra uno de ellos). Los mismos permitieron descartar aquellos ligandos con interacciones electrostáticas desfavorables (valores positivos, cercanos al color rojo) y todos aquellos con interacciones hidrofóbicas débiles (valores cercanos a cero, color blanco). Además, estos gráficos fueron de utilidad para identificar los principales aminoácidos con los cuales las **PQd** presentan interacciones en el sitio activo, dato fundamental para análisis posteriores.

En esta instancia, se decidió realizar un análisis individual para las **PQd** en su forma tautomérica *ceto 1*; y por otro, las **PQd** en todas sus formas tautoméricas. Estas últimas, fueron sometidas a un filtro adicional: la magnitud de los puentes de hidrógeno en base a la distancia y ángulo entre donador-aceptor.

Otra de las estrategias utilizadas para continuar con el proceso de selección fue el análisis de los perfiles de interacción estructural (SIF, por sus siglas en inglés: *Structure Interaction Fingerprints*), los cuales son de utilidad

Figura 4.20.

Mapas de interacciones de la pose de *docking* del ligando (valores de y) con cada residuo de la Chk1 (valores de x).

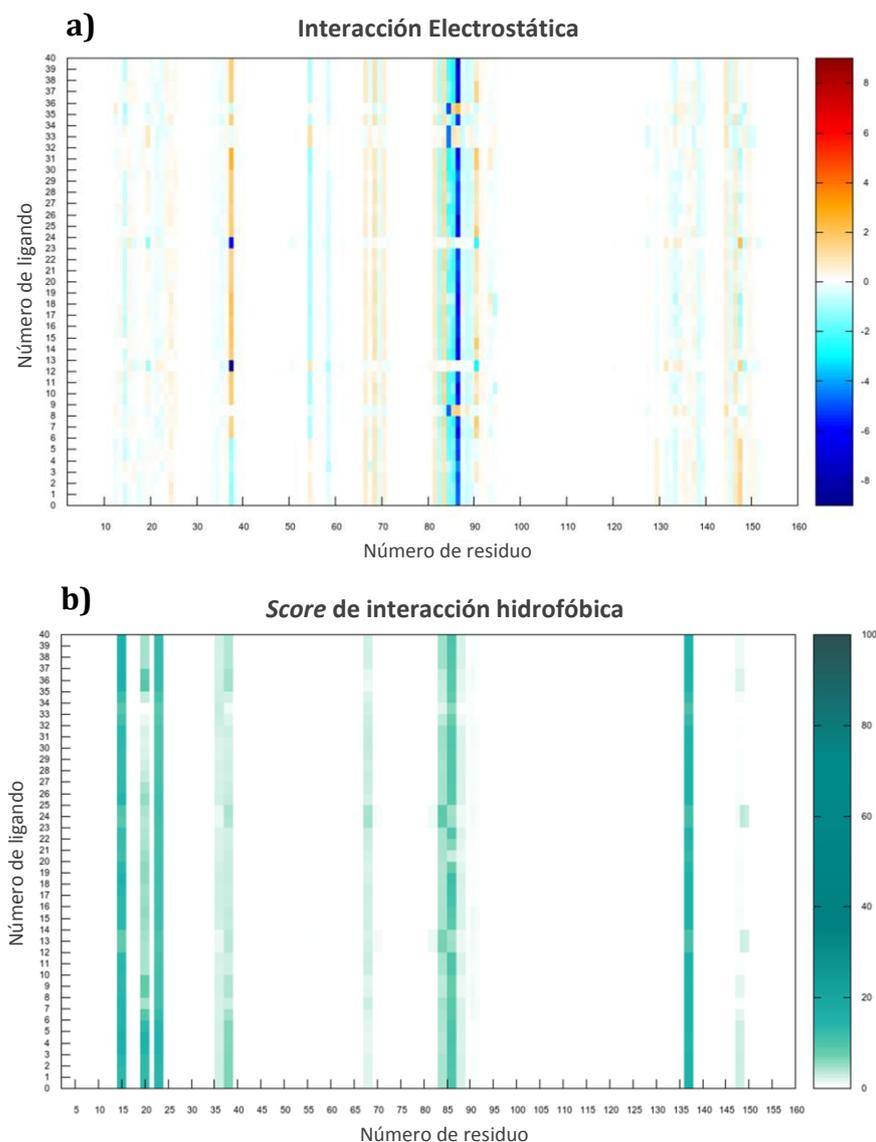
a) Interacciones electrostáticas. Escala colorimétrica:

rojo = desfavorables
azul = favorables;

b) Interacciones hidrofóbicas. Escala colorimétrica:

verde = fuertes
blanco = débiles.

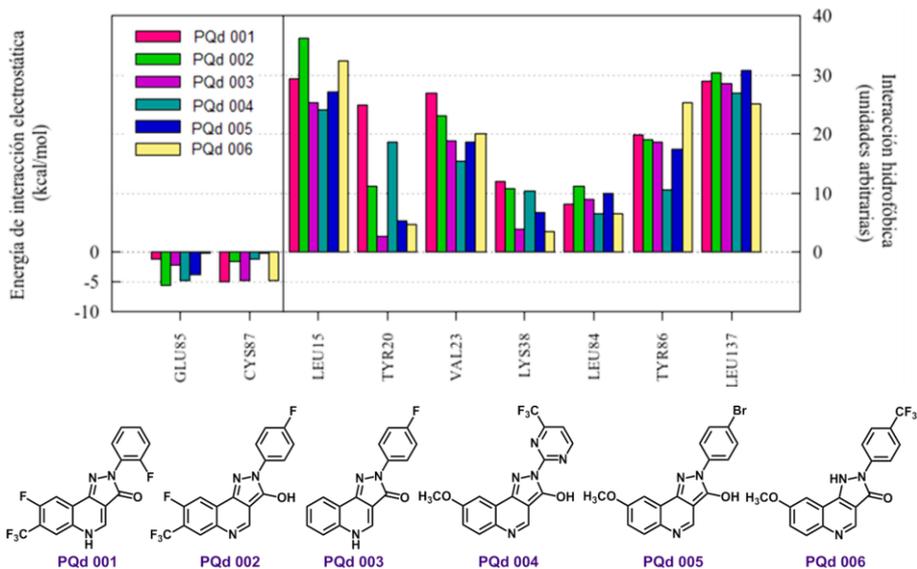
Se graficó solo hasta el residuo 160 ya que el ligando no presentaba interacciones con residuos posteriores.



para organizar y visualizar la información codificada en complejos ligando-receptor.⁵⁸ Entonces, realizando varios gráficos de SIF similares a los mostrados en la Figura 4.21, se lograron seleccionar los seis compuestos finales de cada grupo, incluyendo solo la mejor pose de *docking* de cada ligando.

Finalmente, se analizó el patrón de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los ligandos y los principales residuos de la proteína mediante los gráficos de SIF mostrados en la Figura 4.21. Allí se observa que los aminoácidos que contribuyen mayoritariamente a las interacciones hidrofóbicas son Leu15, Val23, Tyr86 y Leu137 y, los ligandos **PQd 001** y **PQd 004** también presentan una fuerte interacción con Tyr20. En cuanto a las atracciones electrostáticas se observa que las **PQd** en su forma ceto (**PQd 001**, **PQd 003**, **PQd 006-010**) presentan mayor

a) Mejores estructuras de *docking* considerando todos los tautómeros de PQd.



b) Mejores estructuras de *docking* considerando solo el tautómero ceto 1 de PQd.

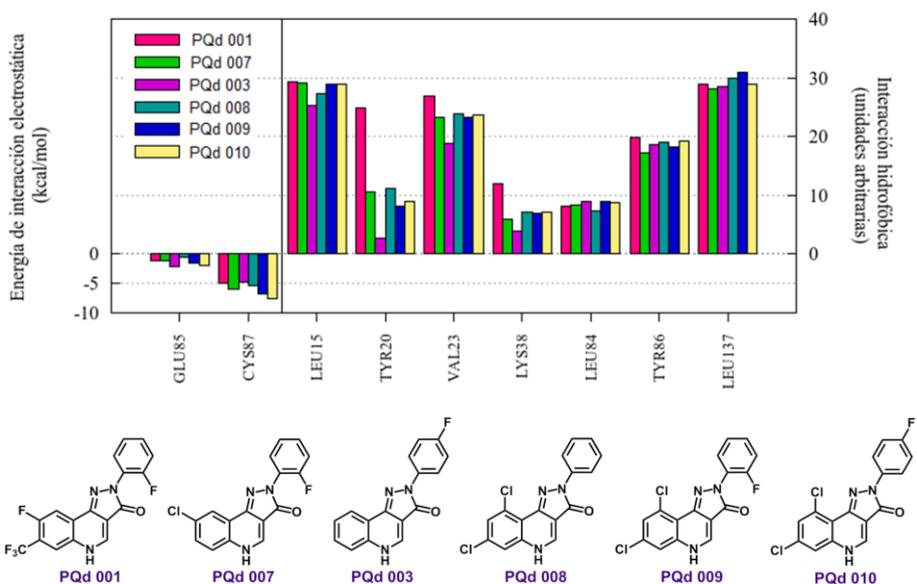


Figura 4.21.

SIF que resumen las interacciones de las seis mejores estructuras encontradas en el estudio de *docking* utilizando el protocolo *Gold-goldscore* y la proteína 1ZYS.

a) Resultados provenientes del análisis teniendo en cuenta todas las formas tautoméricas de PQd.

b) Resultados provenientes del análisis restringido al tautómero ceto 1 de PQd.

Los gráficos muestran la energía de interacción electrostática (izquierda) y las interacciones hidrofóbicas (derecha) con los residuos del sitio activo (valores de x).

interacción con Cys87 debido en parte a la formación de puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico de estos ligandos y el amino de dicho residuo (Figura 4.21 y 4.22.a). Sin embargo, las PQd en su forma enol (PQd 002, PQd 004 y PQd 005) presentan mejor interacción con Glu85 (Figura 4.21.a). Este hecho se debe a que las mismas presentaron un modo de ligado diferente en el sitio activo (*binding mode 2*), lo que permite la formación de un puente de hidrógeno entre el OH del pirazol y el oxígeno carbonílico de Glu85, y otro entre el amino del núcleo de quinolona y la Cys87 (Figura 4.22.b). Es importante recordar que los

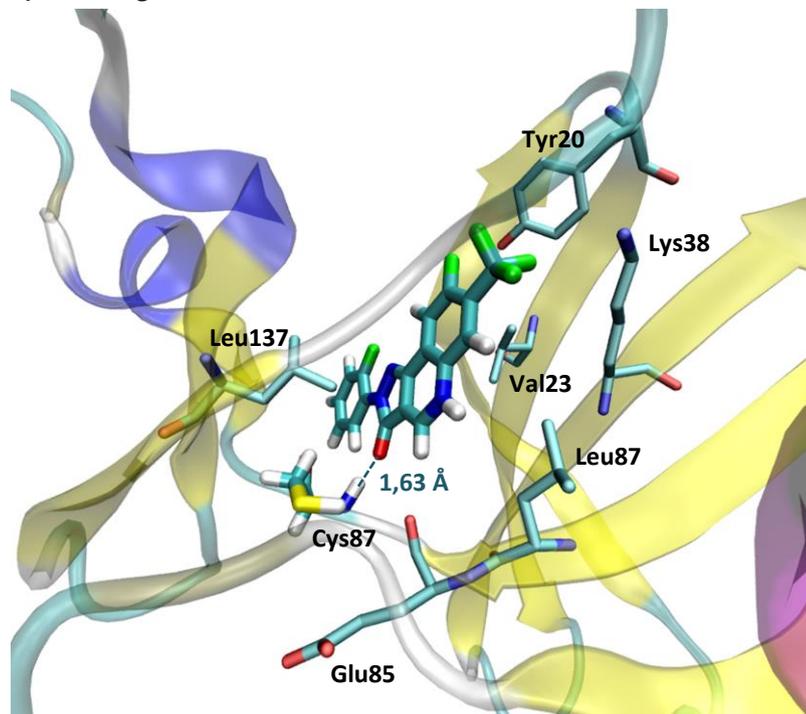
puentes de hidrógeno son un tipo particular de interacción (evaluados mediante ángulo y distancia), aunque la disposición de las cargas entre los heteroátomos y el hidrógeno contribuyen a la energía electrostática; motivo por el cual probablemente estos ligandos no presenten una fuerte interacción electrostática con Cys87, a pesar de formar puente de hidrógeno (Figura 4.21.a).

Figura 4.22.

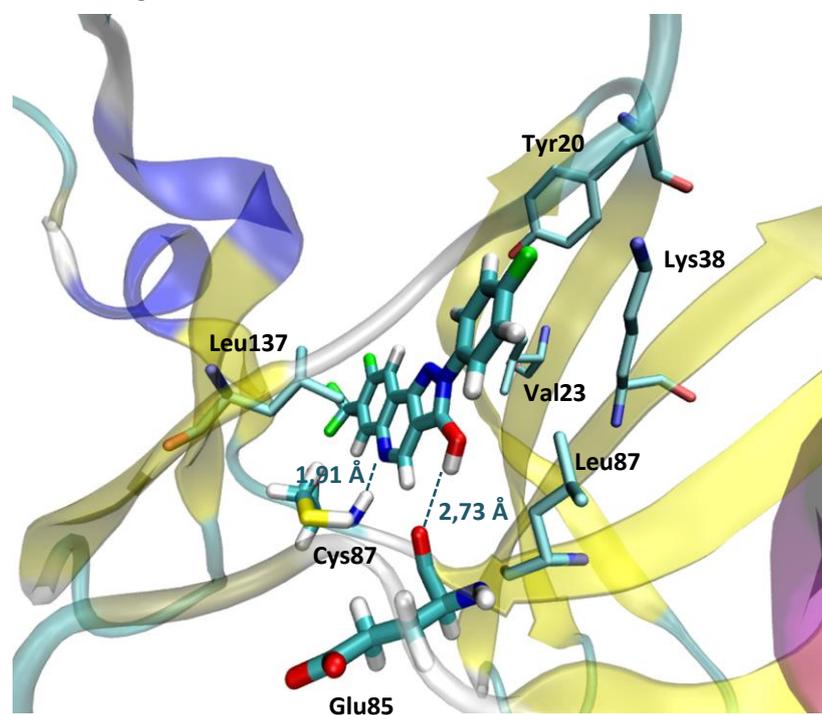
a) Binding mode 1: representación del modo de ligado de **PQd 001** en el sitio activo, el cual permite la formación de puente de hidrógeno con Cys87.

b) Binding mode 2: representación del modo de unión de **PQd 002** formando puente de hidrógeno con Glu85. Se muestran también los residuos importantes para las interacciones hidrofóbicas.

a) Binding mode 1



b) Binding mode 2



4.4.1. Simulaciones de dinámica molecular *post-docking*

En base a los resultados de *docking* de **PQd** en el sitio activo de Chk1 se seleccionó **PQd 001** para realizar los cálculos posteriores de DM, ya que fue el compuesto que presentó, en general, las mejores interacciones tanto electrostáticas como hidrofóbicas.

Dichas simulaciones de DM se realizaron partiendo de la pose de *docking* del compuesto en sus tres formas tautoméricas y analizando la evolución del complejo ligando-proteína en función del tiempo. Además, para poder luego hacer un estudio comparativo, se realizó el mismo tipo de simulación para una de las **PQd** seleccionadas en el estudio de *docking* que presentó interacciones desfavorables en el sitio activo de la proteína (**PQd 240**) y para el compuesto **YEX** tomado como referencia por ser el ligando co-cristalizado con mejor actividad inhibitoria *in vitro* hasta el momento ($IC_{50} = 0,1 \text{ nM}$).⁴⁹

Luego de las etapas de preparación y equilibrio, se monitorearon propiedades energéticas y estructurales durante los 100 ns de la etapa de producción para evaluar la calidad de la simulación y llevar a cabo los respectivos

4.4. Simulaciones de dinámica molecular de pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas en la Chk1

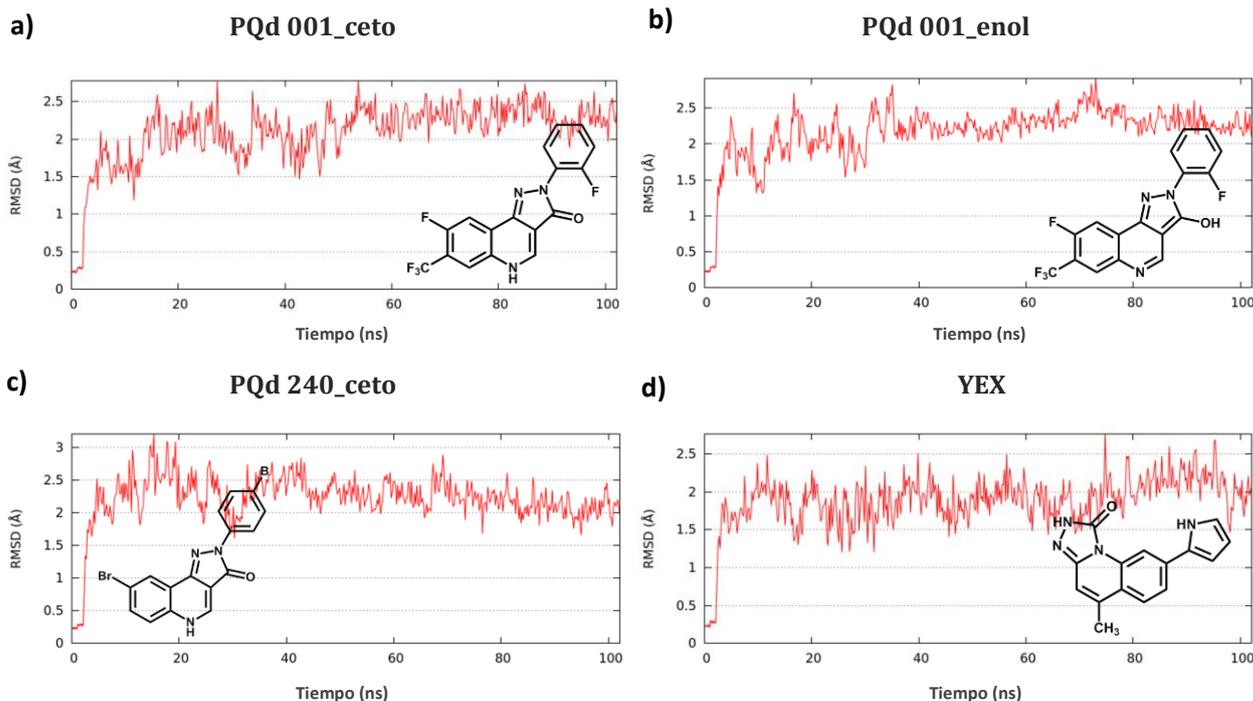


Figura 4.24. RMSD calculado respecto a los $C\alpha$ del *backbone* de la proteína cuando están presentes: **a)** PQd 001 en su tautómero ceto 1 (PQd 001_ceto). **b)** PQd 001 en su tautómero enol (PQd 001_enol). **c)** **PQd** con interacciones desfavorables en el sitio activo de la proteína (PQd 240_ceto). **d)** Compuesto de referencia YEX.

análisis. En primer lugar, se observó que la proteína permaneció estable durante toda la etapa de producción, ya que el RMSD de todos los $C\alpha$ del *backbone* relativo a la estructura inicial, alcanza la meseta a los 2 ns de la simulación con un valor de RMSD ~ 2 Å (Figura 4.24).

Mediante el análisis del RMSD del ligando puede analizarse el movimiento del mismo respecto a su posición inicial (pose de *docking* para el caso de las **PQd** o pose cristalográfica para el compuesto de referencia). En la Figura 4.25 puede observarse que **YEX** es estable durante toda la trayectoria (RMSD $\sim 1,5$ Å), indicando que la estructura inicial de la DM es razonable. Mientras que las **PQd** tienden a modificar su pose de *docking* apenas comienza la simulación de DM. En particular, **PQd 240** cambia su orientación en menos de 2 ns permaneciendo a un valor de RMSD promedio ~ 6 Å respecto a su pose inicial. En cuanto a **PQd 001_ceto** se observa que cambia levemente su conformación inicial y allí permanece estable solo por 14 ns (RMSD promedio 1,5 Å), luego vuelve a cambiar su posición por apenas 3 ns, hasta que finalmente realiza un último movimiento y luego permanece estable durante el resto de la dinámica, aunque con un RMSD promedio de ~ 5 Å (Figura 4.24.a). El tautómero enol (**PQd 001_enol**) fue la estructura que presentó un comportamiento más similar a

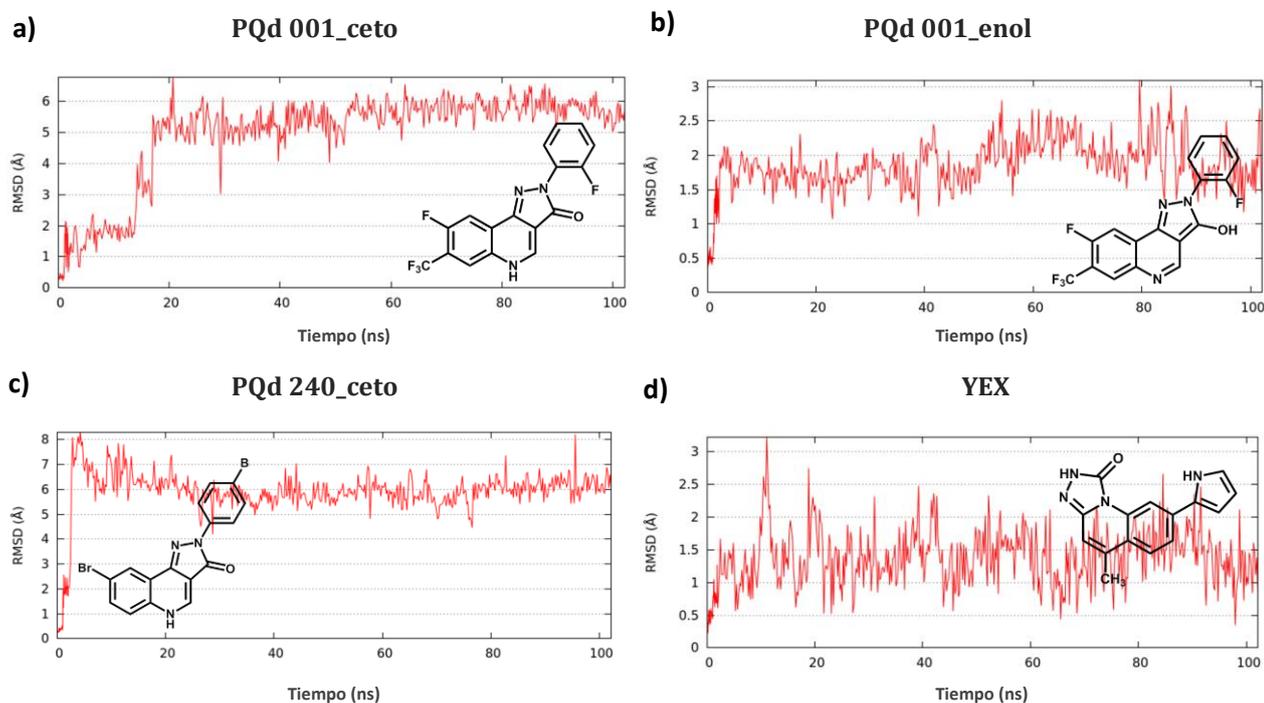


Figura 4.25. RMSD calculado respecto a todos los átomos del ligando durante los 100 ns de DM: **a)** PQd 001_ceto. **b)** PQd 001_enol. **c)** PQd 240_ceto. **d)** Referencia: YEX.

YEX, ya que fue la más estable en su conformación inicial (RMSD promedio ~ 2 Å).

El RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) fue calculado respecto al valor medio de los C α de cada residuo, dando así una idea de la flexibilidad del *backbone* de la proteína. En la Figura 4.26 se observa que la fluctuación de los residuos de la proteína en complejo con las **PQd** (ceto) fue muy similar a la del compuesto de referencia, a excepción del tautómero enol (Figura 4.26.b) que presentó una flexibilidad levemente mayor en la zona de los residuos 125-150. Dichos resultados indican que el comportamiento de la proteína prácticamente no se modifica según el tipo de inhibidor que este unido (**PQd** o **YEX**).

En cuanto al análisis energético, se evaluó el cambio de la energía de interacción ligando-proteína en función del tiempo. En la Figura 4.27 puede apreciarse la sumatoria de la energía total acumulada ($\sum_{i=1}^n E_{tot_i} = \sum_{i=1}^n (E_{vdw_i} + E_{ele_i})$), junto con la variación del RMSD del ligando (calculado respecto a su centro de masa) durante la simulación. Analizando la variación de la energía total se observa que el ligando **PQd 001_ceto** es más estable en su primera conformación (primeros 10 ns), ya que la pendiente de la curva es más negativa, mientras que al cambiar de posición (observar la variación del RMSD de ligando), también lo hace la pendiente

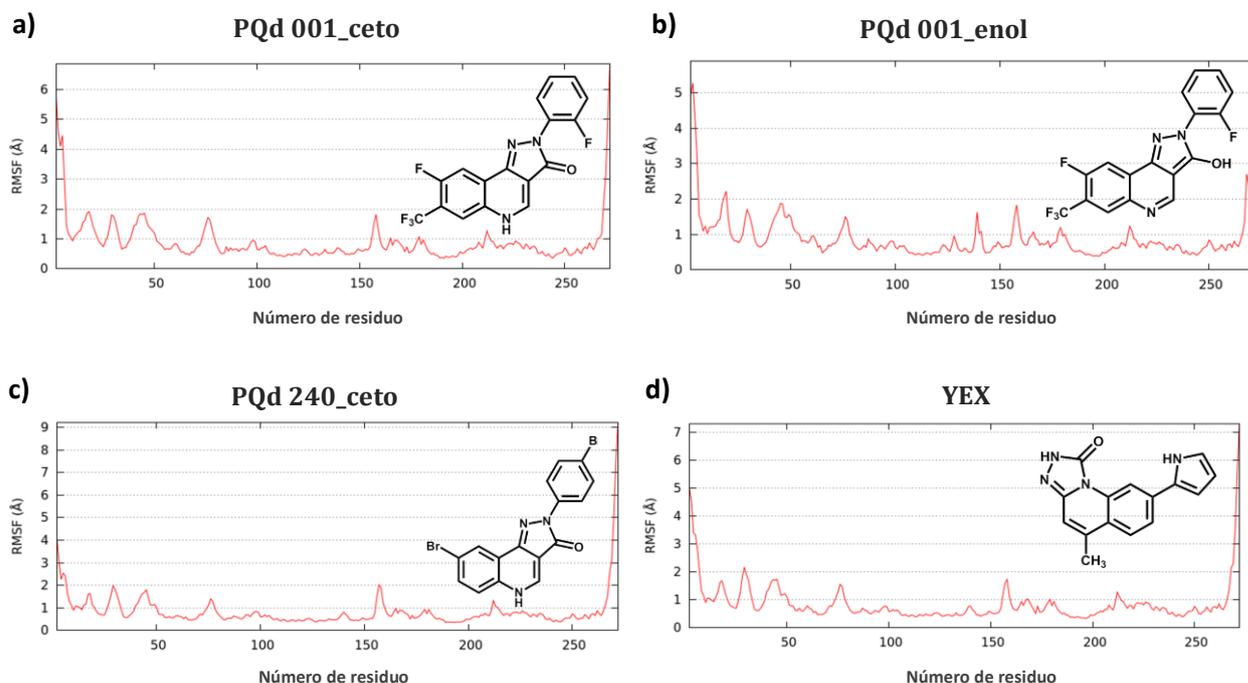


Figura 4.26. RMSF de los C α de cada residuo de la proteína durante los 100 ns de DM: **a)** PQd 001_ceto. **b)** PQd 001_enol. **c)** PQd 240_ceto. **d)** Referencia: YEX.

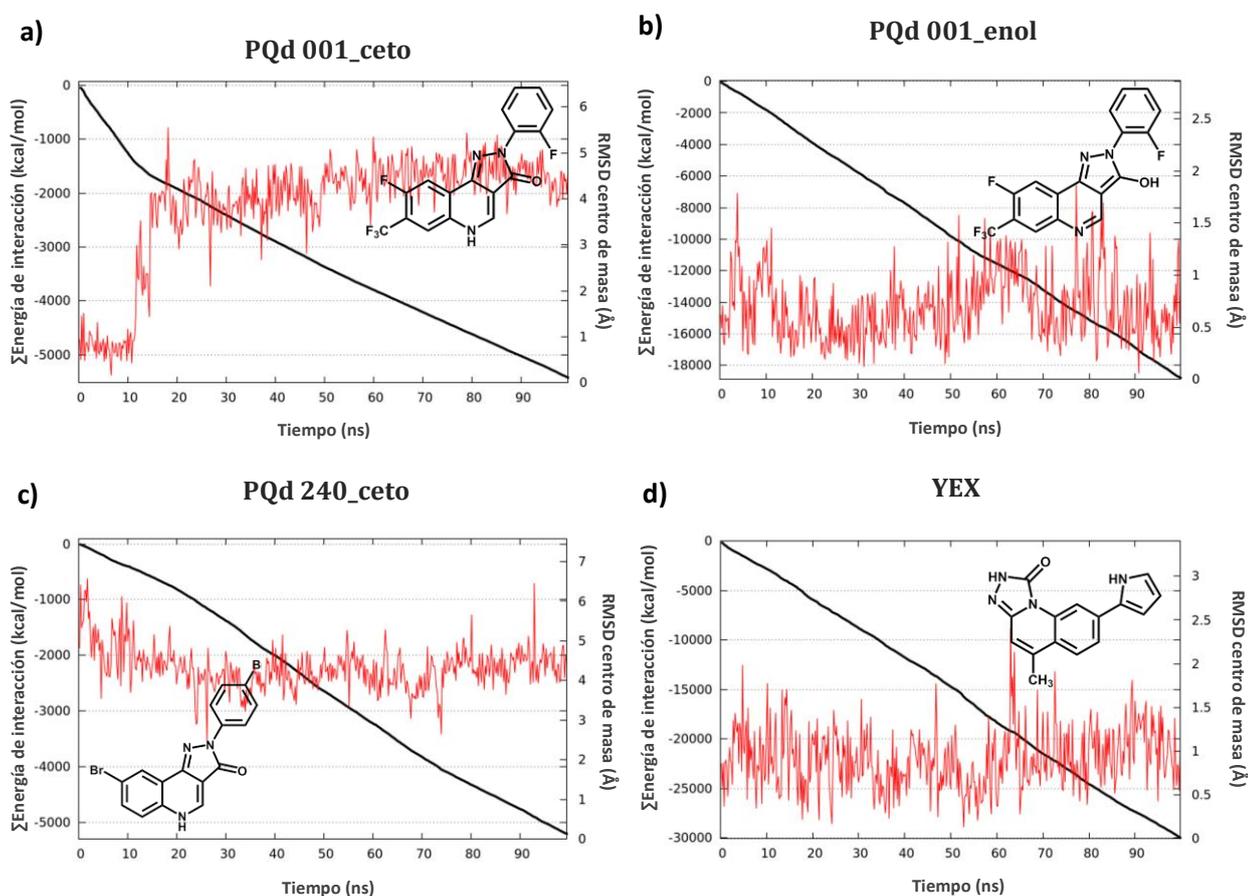


Figura 4.27. Variación del RMSD del ligando respecto al centro de masa del mismo (curva roja) y sumatoria de la energía de interacción total ($\sum_{i=1}^n E_{tot_i} = \sum_{i=1}^n (E_{vdW_i} + E_{ele_i})$) durante los 100 ns de DM (curva negra): **a)** PQd 001_ceto. **b)** PQd 001_enol. **c)** PQd 240_ceto. **d)** Referencia: YEX.

hacia un valor menos negativo, indicando que la energía de interacción es más desfavorable (Figura 4.27.a). En cuanto a **PQd 240_ceto** se observa que cambia mucho su posición respecto a la inicial (RMSD promedio $\sim 5 \text{ \AA}$) y su energía de interacción con la proteína es poco favorable (Figura 4.27.c). El tautómero enol (**PQd 001_enol**) fue el que se comportó de manera más similar al ligando de referencia. Durante toda la trayectoria, este tautómero permaneció en una pose similar a su estructura inicial (variación del RMSD $\sim 1 \text{ \AA}$), por lo que la energía se mantuvo relativamente constante arribando a un valor final de -18000 kcal/mol (Figura 4.27.b y 4.27.d). Sin embargo, cabe destacar que la energía de interacción del ligando de referencia fue mucho más favorable (más negativa) que la correspondiente para las **PQd**, en particular los valores de energía de interacción de los tautómeros ceto con la proteína (-5000 kcal/mol) fueron muy pequeños comparados con **YEX** (-30000 kcal/mol).

4.4.2. Simulaciones de dinámica molecular supervisada

Las simulaciones de DM supervisada o **SuMD** (por sus siglas en inglés: **Supervised Molecular Dynamics**) es una metodología desarrollada en el grupo del Prof. Stefano Moro (*Molecular Modeling Section*, Universidad de Padova, Italia) que permite explorar el proceso de reconocimiento ligando-receptor en una escala de nanosegundos (ns) mediante la incorporación de un algoritmo de supervisión en la distancia de aproximación ligando-receptor en una simulación de DM convencional (Figura 4.28).⁵⁹ Durante la etapa de producción, la distancia entre el centro de masa del ligando y los residuos que componen el sitio activo de la Chk1 ($d_{cm_{L-R}}$) es monitoreada por un periodo de 600 ps (*step* de SuMD). De cada *step* se toman cinco puntos (a, b, c, d, e) los cuales se ajustan a una función $f(x) = m \cdot x$. Luego, si $m < 0$, indica que la distancia ligando-receptor se reduce por lo que la simulación de DM continúa adelante. Por el contrario, si $m > 0$, dicho *step* es descartado y la simulación es restaurada desde las coordenadas del ultimo *step* con $m < 0$. Dicho algoritmo es implementado hasta que $d_{cm_{L-R}} < 5 \text{ \AA}$.

Mientras que las DM *post-docking* permiten analizar el comportamiento del ligando una vez en el sitio activo, las DM supervisadas permiten estudiar el proceso de reconocimiento ligando-receptor, analizar los cambios conformacionales en la proteína al interactuar con el

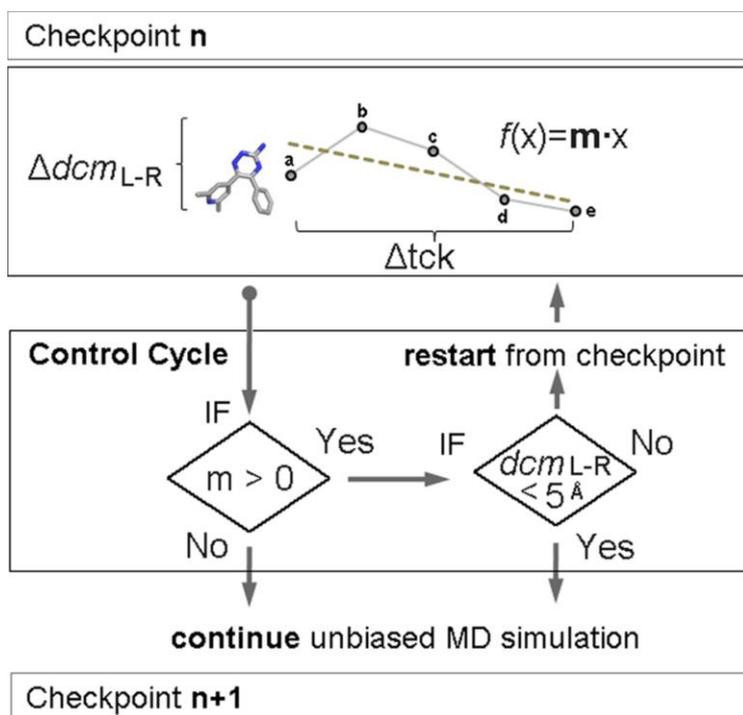


Figura 4.28.

Esquema del algoritmo de supervisión en la distancia ligando-receptor ($d_{cm_{L-R}}$) implementado en SuMD. Extraído de ref. 59.

ligando y conocer cuáles son los residuos involucrados en la unión del mismo en el sitio activo.

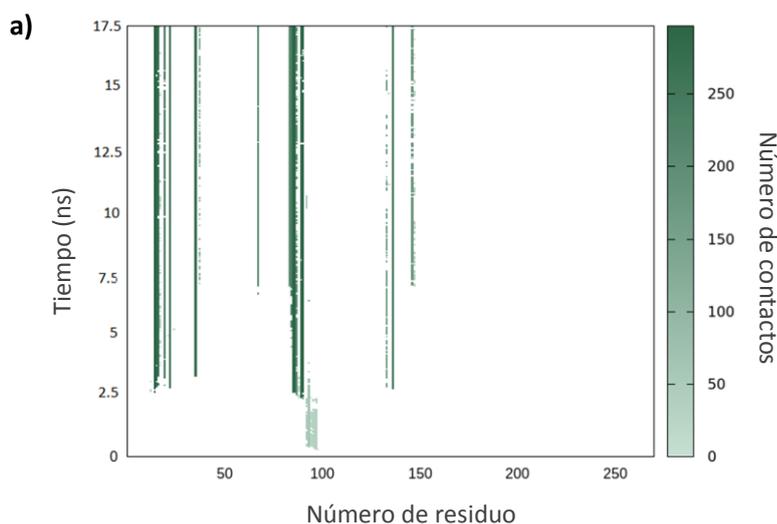
Esta metodología fue utilizada para estudiar el proceso de reconocimiento entre Chk1 y **PQd 001**, **PQd 240** (solo en su forma tautomérica ceto 1) y el compuesto de referencia **YEX**.

En la simulación de SuMD el primer sitio de reconocimiento alcanzado por el ligando **YEX** está conformado por Glu97, Pro98 y Asp99 (Figura 4.29.a), aunque inmediatamente se estabilizó entre Asp94, Arg95 e Ile96 hasta los 2 ns de la simulación (primer meseta, Figura 4.29.b). Estos tres residuos junto con Gly89 y Gly90 son quienes permitieron a **YEX** posicionarse y orientarse hacia el sitio activo, siendo finalmente Glu91 y Leu15 los cuales definieron el ingreso al sitio en menos de 4 ns. El ligando permaneció allí hasta el final de la simulación (Figura 4.29.b), interactuando con Leu15, Gly16, Glu17, Val23, Lys38, Leu84, Glu85, Cys87, Leu137 y Ser147 (Figura 4.29.a) con una energía entre -40 y -60 kcal/mol (Figura 4.29.c). En la Figura 4.29.b se observa que al finalizar la simulación, el RMSD entre la estructura cristalográfica y la pose final de la DM es ~ 5 Å ya que ambas estructuras están rotadas 180° ; por tal motivo es que la pose final de **YEX** en la simulación de DM forma un puente de hidrógeno con Cys87 y Glu91, pero no presenta interacciones de este tipo con Glu85 como se observa en su estructura cristalográfica⁴⁹ (Figura 4.29.d). Sin embargo, los centros de masa de ambas estructuras coincidieron y sus energías fueron comparables ($E_{\text{tot}} = -31,18$ y $-22,29$ kcal/mol) por lo que puede decirse que la pose final de la DM fue aceptable.

Figura 4.29

Análisis de la simulación de SuMD del ligando de referencia **YEX**.

a) Mapa de reconocimiento ligando-proteína.



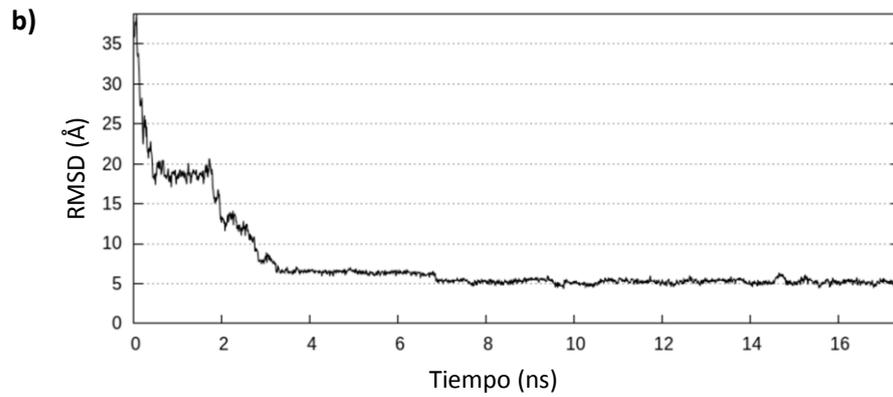


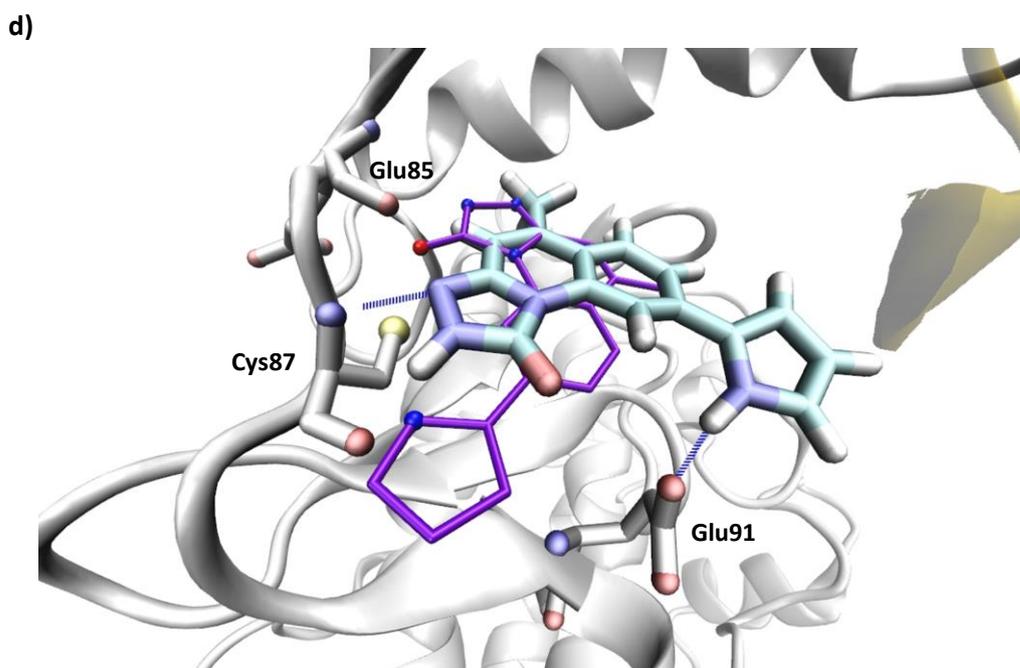
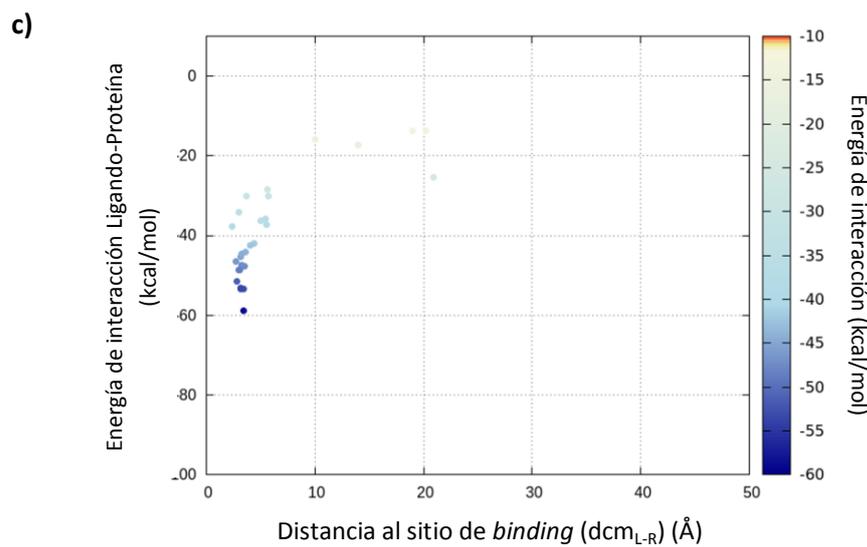
Figura 4.29 (Continuación)

b) Mapa de reconocimiento ligando-proteína.

c) RMSD respecto a la pose cristalográfica calculado sobre todos los átomos de los ligandos.

d) Energía de interacción ligando-proteína vs. distancia al sitio de *binding* ($d_{cm_{L-R}}$).

e) Estructura cristalográfica (violeta) y pose final de DM.



La primera interacción entre el ligando **PQd 001** con la Chk1 ocurrió a los 1,5 ns y fue mediada por Glu17, Gly18 y Ala19 como puede observarse en la Figura 4.30.a. Posteriormente el *loop* que contiene estos tres aminoácidos se movió junto con el ligando, generando nuevas interacciones con Glu91, Glu134 y Asp148 donde permaneció hasta los 4,5 ns (primer meseta en la Figura 4.30.b). Luego, ayudado por Lys132, Glu134 y Asp148, el ligando comenzó a orientarse hacia el sitio activo y permaneció estable por 3 ns a una distancia $\sim 8 \text{ \AA}$ del centro de masa de la cavidad de *binding* (segunda meseta Figura 4.30.b y 4.30.c). Finalmente, a partir de 9 ns comenzó el ingreso al sitio de unión del ATP, mediado por una interacción con Leu15 y Glu91, los cuales determinaron otro cambio de orientación que lo llevó a encontrar su posición final (tercer meseta, Figura 4.30.b). Allí, permaneció interaccionando con Val23, Lys38, Leu 84, Glu85, Tyr86, Cys87, Glu91, Leu137, Ser147 y Asp148 a una distancia de $\sim 4 \text{ \AA}$ del centro de masa de la cavidad y con una energía de interacción ligando-proteína entre -50 y -70 kcal/mol (Figura 4.30.a y 4.30.c). Se observó además que la pose final de DM fue diferente a la pose de *docking* tomada como referencia (RMSD $\sim 7 \text{ \AA}$, Figura 4.30.b), por lo que **PQd 001** no establece el puente de hidrógeno con Cys87, sino que interacciona con Asp148.

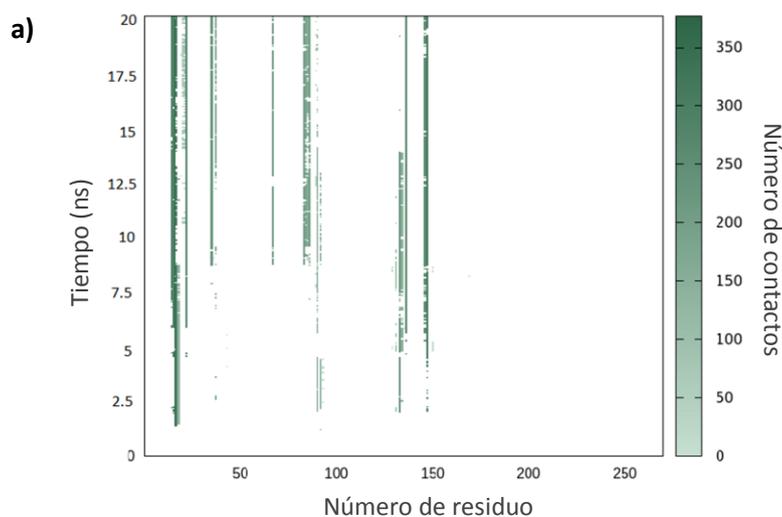
Figura 4.30

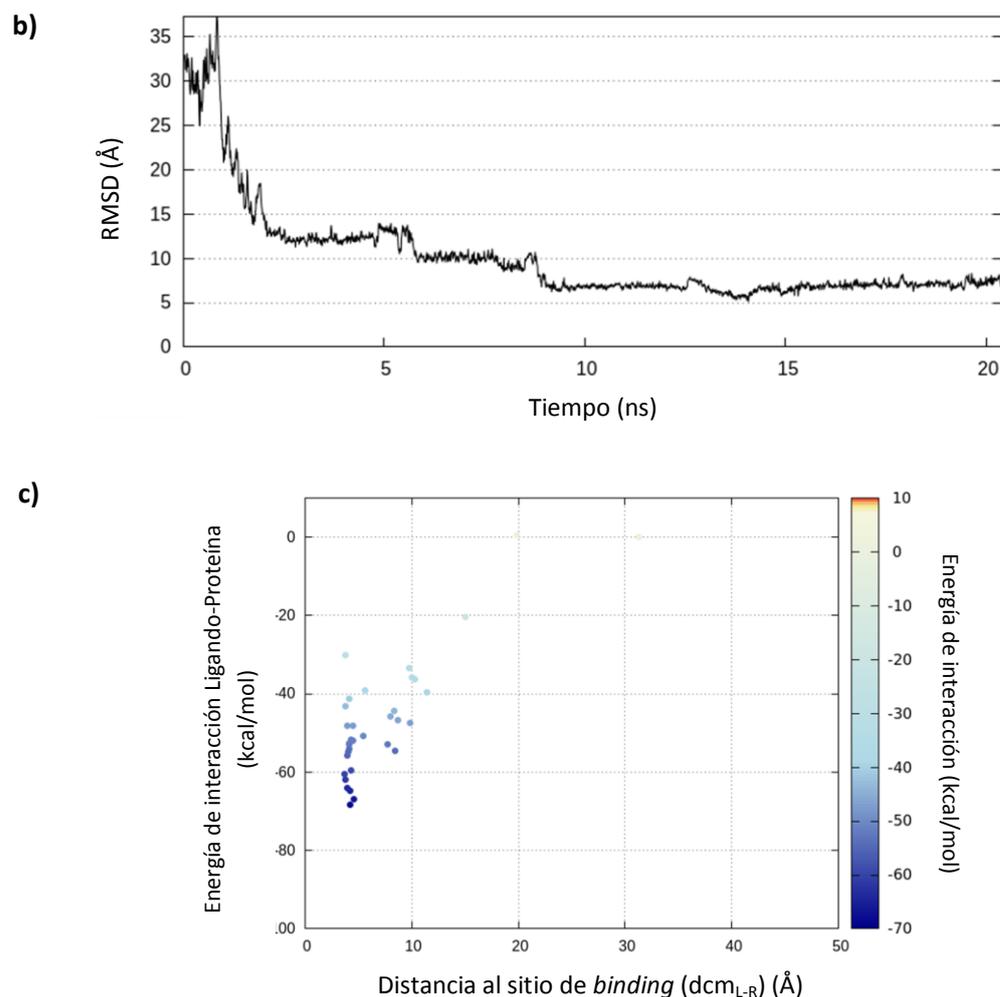
Análisis de la simulación de SuMD de **PQd 001**.

a) Mapa de reconocimiento ligando-proteína.

b) RMSD respecto a la pose de *docking* calculado sobre todos los átomos de los ligandos.

c) Energía de interacción ligando-proteína vs. distancia al sitio de *binding* ($d_{cm_{L-R}}$).





En cuanto al ligando **PQd 240** se observó que éste entró al sitio activo por una zona diferente a los otros dos ligandos y por lo tanto, el ingreso fue mediado por distintos aminoácidos (puede observarse la diferencia en los mapas de reconocimiento ligando-proteína, Figura 4.31.a). El primer sitio de contacto con la Chk1 fue entre los residuos Leu11, Val12 y Gln13, luego, mediante interacción con Thr14 y Leu15 cambió de orientación y fue atraído por Val23, Leu32, Tyr86 y Ser88 donde persistió unos 4 ns (primera meseta, Figura 4.31.b). Posteriormente, se aproximó a Tyr86 con la cual estableció una interacción π - π *stacking*, además de estar en contacto con Tyr71, Glu85, Glu140 y Asp139 durante 6 ns. Finalmente, fueron Tyr86 y Leu15 los residuos que mediaron el ingreso del ligando al sitio activo. Una vez allí, **PQd 240** permaneció hasta el final de la simulación cambiando continuamente su posición, como puede observarse en la variación de RMSD (Figura 4.31.b) y en la oscilación de puntos entre 2-8 Å (Figura 4.31.c). Las principales

interacciones de **PQd 240** en el sitio activo fueron con los residuos Leu15, Val23, Leu34, Ala36, Lys38, Tyr86, Cys87, Ser88, Glu91, Glu134, Leu137, Ser147 y Asp148, presentando una energía de interacción menos negativa que los ligandos anteriores (entre -30 y -50 kcal/mol).

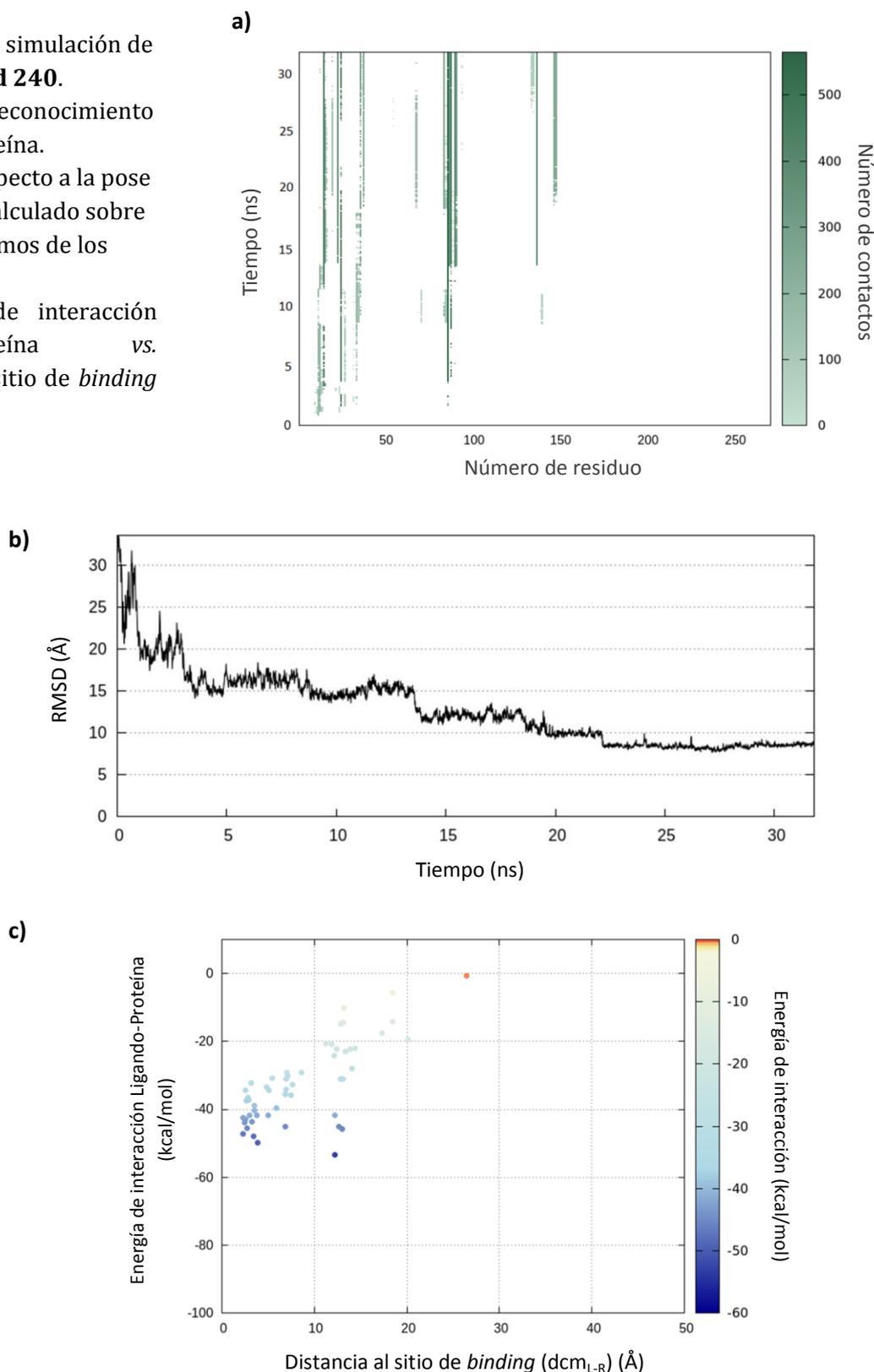
Figura 4.31

Análisis de la simulación de SuMD de **PQd 240**.

a) Mapa de reconocimiento ligando-proteína.

b) RMSD respecto a la pose de *docking* calculado sobre todos los átomos de los ligandos.

c) Energía de interacción ligando-proteína vs. distancia al sitio de *binding* ($d_{cm_{L-R}}$).



Los procesos de reconocimiento ligando-receptor descritos anteriormente se resumen en la Figura 4.32. Allí se muestran los cambios de dirección recorridos por el ligando (flechas) y el tiempo de permanencia cercano a cada residuo, el cual es representado mediante esferas cuyo centro es la posición promedio del ligando y cuyo radio es proporcional al tiempo de permanencia en esa región. Puede observarse que el ligando de referencia **YEX** y **PQd 001**

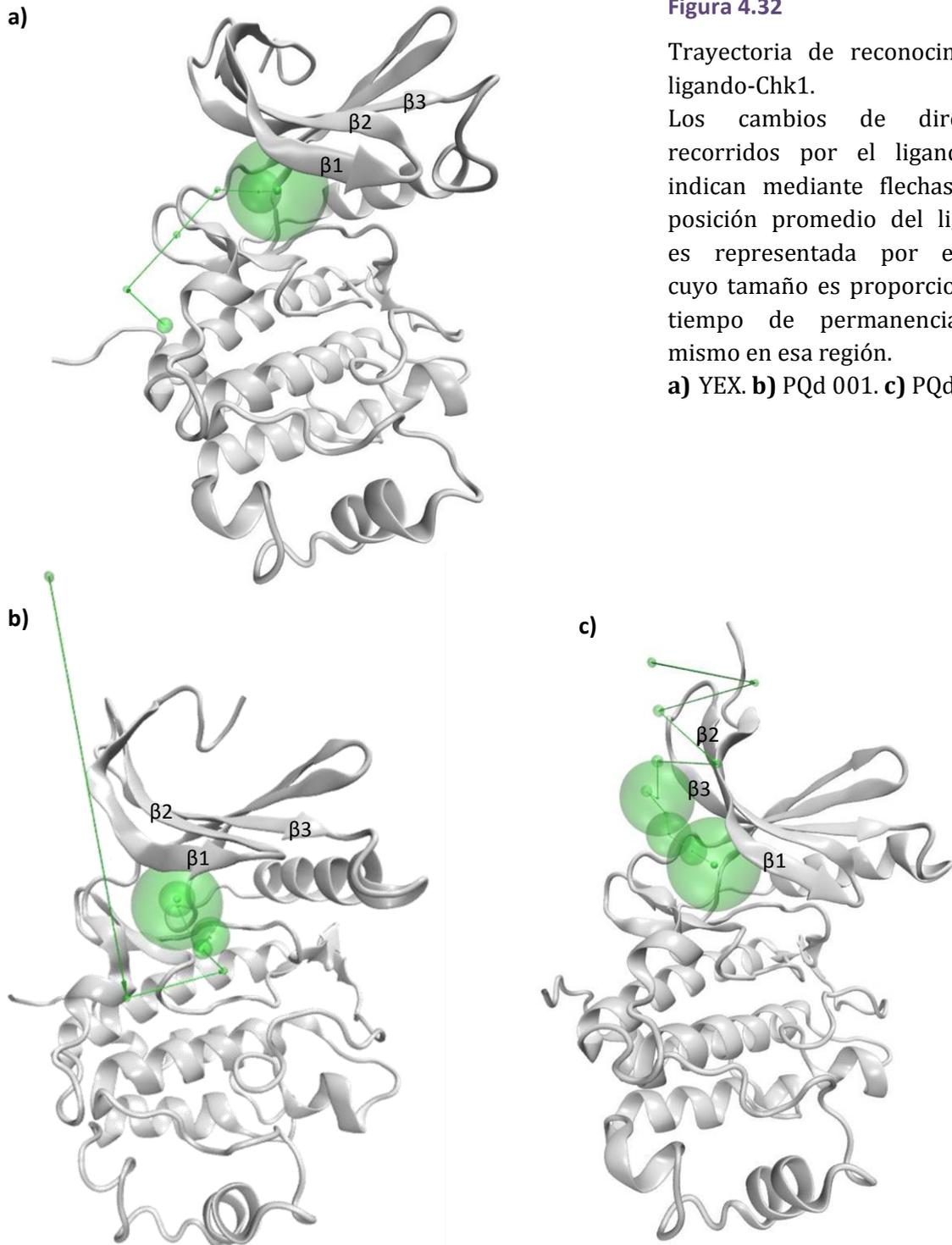


Figura 4.32

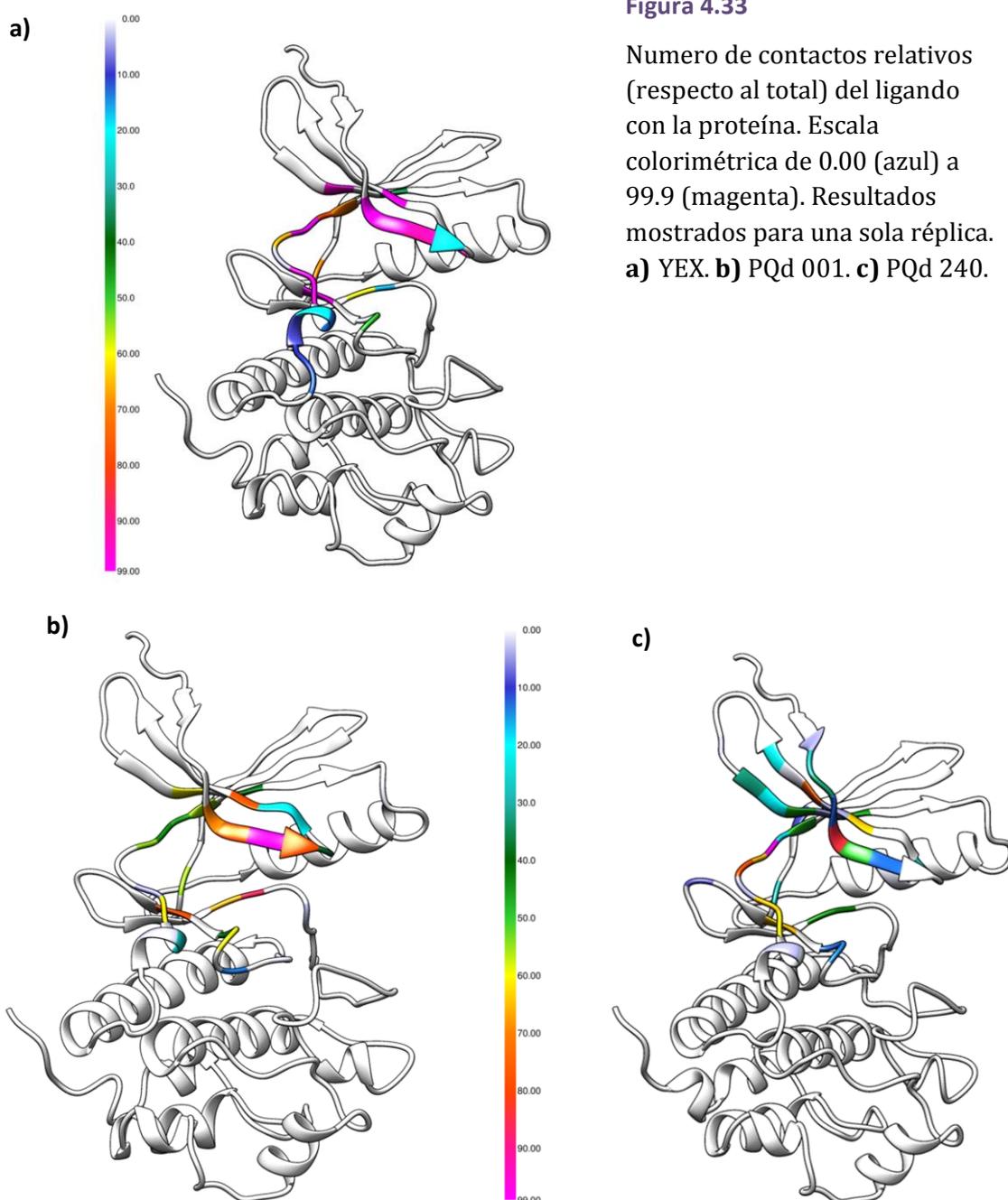
Trayectoria de reconocimiento ligando-Chk1.

Los cambios de dirección recorridos por el ligando se indican mediante flechas y la posición promedio del ligando es representada por esferas cuyo tamaño es proporcional al tiempo de permanencia del mismo en esa región.

a) YEX. b) PQd 001. c) PQd 240.

ingresaron al sitio activo pasando entre la lámina $\beta 1$ y el *loop* de activación, aunque el compuesto de referencia lo hizo en un modo más directo. Sin embargo, el ligando **PQd 240** accedió al sitio activo a través de la lámina $\beta 2$ y la $\beta 3$.

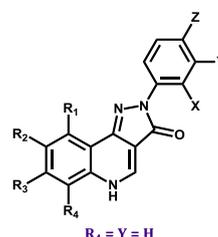
El análisis de todas las réplicas para cada compuesto ha demostrado que la mayor parte del tiempo los ligandos **YEX** y **PQd 001** permanecieron en el *loop* entre la lámina $\beta 1$ y $\beta 2$, en particular al final de la $\beta 1$, en contacto con los residuos Leu15, Val23 y Lys38; mientras que **PQd 240** presentó mayor número de contactos con Tyr86 en el *loop* que unido al dominio de α -hélices y láminas β (Figura 4.33).



4.5.1. Ensayos de la actividad inhibitoria de Chk1 por pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas

En base a los estudios computacionales previos, se seleccionaron doce **PQ** para su evaluación como inhibidores de Chk1. El nivel de inhibición de estos compuestos fue determinado por la empresa ProQinase (Freiburg, Alemania) midiendo la actividad residual de la quinasa Chk1 a una sola concentración de ligando (1 μ M) por duplicado (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Valores de actividad residual de la Chk1 en presencia de **PQ**.



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	X	Z	Actividad residual (%) ^a
PQ3	H	H	H	H	F	97
PQ11	H	OCH₃	H	H	F	121
PQ14	H	Cl	H	F	H	96
PQ15	H	Cl	H	H	F	110
PQ16	H	Cl	H	H	OCH₃	124
PQ17	Cl	H	Cl	H	H	109
PQ18	Cl	H	Cl	F	H	89
PQ19	Cl	H	Cl	H	F	117
PQ20	Cl	H	Cl	H	OCH₃	123
PQ23	H	Br	H	H	F	123
PQ28	H	F	CF₃	F	H	91
PQ29	H	F	CF₃	H	F	98

a- Valor promedio de dos mediciones.

Como se observa en la Tabla 4.4 la actividad residual de la Chk1 continúa siendo alta, indicando que ninguno de los compuestos evaluados mostró actividad inhibitoria significativa a una concentración de 1 μ M, lo que no descartaría que a mayores concentraciones (< 100 μ M) puedan mostrar efecto inhibitorio.

Generalmente, la actividad biológica de un compuesto depende de la afinidad por el sitio de unión en el blanco, la cual está determinada por la geometría y su complementariedad fisicoquímica. Por lo tanto, es crucial

4.5.

Actividad inhibitoria *in vitro*

4.6.

Actividad *in vitro* vs. simulaciones computacionales

demonstraron que cambiando el sustituyente pirrol de **YEX** por un imidazol o tiazol, la IC_{50} aumenta de 0,1 a 160 y 2960 nM respectivamente (Figura 4.35). Esta disminución de la actividad se debe a la pérdida del puente de hidrógeno adicional que se genera entre el NH del pirrol con la Cys87.

La mayoría de los inhibidores con alta afinidad por el sitio de unión del ATP en la Chk1 (IC_{50} en el orden de concentraciones nM), presentan al menos dos interacciones de puente de hidrógeno con residuos del sitio activo. Pueden mencionarse como ejemplos: **UCN-01** (IC_{50} = 5,6 nM), el cual presenta este tipo de interacción con Glu85 y Cys87,³⁸ **SCH900776** (IC_{50} = 3 nM) con Glu85 y Glu134,⁴⁸ y **YEX** (IC_{50} = 0,1 nM) que muestra un puente de hidrógeno con Glu85 y dos con Cys87.⁴⁹

Además, teniendo en cuenta los modelos de farmacóforo propuestos por Kumar y Ambre, la molécula debería contener al menos uno o dos aceptores de puente de hidrógeno y un donador de puente de hidrógeno, además de un anillo aromático.^{50,51}

Es evidente que las interacciones de hidrógeno tienen una gran influencia sobre la actividad inhibitoria de estos compuestos. Sin embargo, las pirazoloquinolinonas estudiadas presentaron un solo puente de hidrógeno con Cys87 en los estudios de *docking* y en las simulaciones de DM *post-docking* o, en el caso de las simulaciones de SuMD, una interacción muy débil con Asp148.

Tales motivos pueden ser algunas de las hipótesis que ayudan a explicar la inactividad de los compuestos evaluados como inhibidores de Chk1 a la concentración medida (1 μ M).

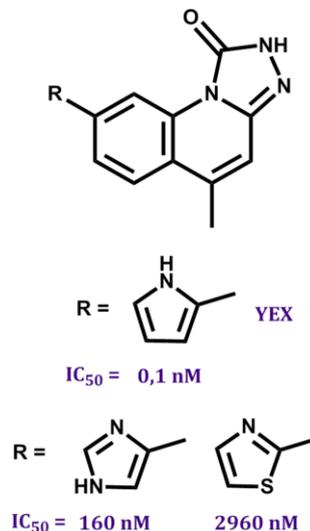


Figura 4.35

Influencia del sustituyente en la actividad inhibitoria de 5-metil-[1,2,4]triazolo [4,3-*a*]quinolin-1(2*H*)-ona.

4.7.1. Simulaciones de *docking* con Autodock 4.0

Las simulaciones de *docking* fueron realizadas con el programa Autodock 4.0¹¹ utilizando Lamarkian GA como algoritmo de búsqueda. El mismo fue configurado con los siguientes parámetros: 250 conformaciones (poses) con un límite de RMSD entre ellas de 2 Å, el centro de la cavidad de *binding* (grilla) fue definido en base a la posición del ligando co-cristalizado, el radio de esta cavidad fue de 20 Å y el *grid spacing* fue de 0,158 Å.

La estructura de la proteína de código 1ZLT fue descargada de la base de datos *RCSB Protein Data Bank*⁶⁰ y la misma fue seleccionada en base a la resolución del cristal y además por presentar una estructura completa.

4.7.

Metodología

Para la preparación de la proteína y los ligandos se utilizó la interfaz gráfica AutoDock Tools implementada en Autodock 4.¹¹ Durante la preparación de la proteína los iones y moléculas de agua fueron removidos, se agregaron solo los hidrógenos polares a la macromolécula y se adicionaron las cargas de Gasteiger. Los ligandos fueron optimizados previamente con Gaussian 09 a nivel DFT, luego se determinaron los enlaces rotables y se computaron las cargas de Gasteiger.

4.7.2. Desarrollo de *DockBench 1.0*

DockBench 1.0 fue escrito en lenguaje de programación *Python* incluyendo algunos *scripts* en *Bash* para crear los archivos de configuración, lanzar las simulaciones de *docking*, organizar y graficar los resultados con Gnuplot 4.6.⁶¹

Todos los cálculos de *docking* se realizaron en un *cluster* de 200 *cores* con sistema operativo Ubuntu (14.04, 64 bit), utilizando los siguientes programas: AutoDock 4.2.5.1,¹¹ AutoDock Vina1.1.2,¹² Glide 6.5,^{13,14} GOLD 5.2,¹⁵ MOE 2014.09,¹⁶ PLANTS 1.2,¹⁷ rDock.¹⁹

Se establecieron varios parámetros comunes entre los diferentes protocolos: cada uno de ellos genera 20 conformaciones (poses) con un límite de RMSD entre ellas de 1 Å, el centro de la cavidad de *binding* fue definido por el centro de masa del ligando en la estructura de rayos X, el radio de esta cavidad fue de 20 Å y el *grid spacing* (solo para aquellos cálculos basados en grillas) fue de 0,375 Å.

De las 108 estructuras de rayos X disponibles en *RCSB Protein Data Bank*⁶⁰ para la Chk1 humana, se utilizaron los siguientes 20 complejos ligando-proteína: 3TKH,⁶² 3TKI,⁶² 1ZYS,⁶³ 4HYI,⁶⁴ 4HYH,⁶⁴ 3OT3,⁶⁵ 2HY0,⁶⁵ 2HXL,⁶⁶ 2QHN,³⁴ 3PA3,⁶⁷ 3PA4,⁶⁷ 3PA5,⁶⁷ 1ZLT,⁶⁸ 3OT8,⁶⁹ 1NVR,³⁸ 1NVS,³⁸ 2YEX,⁴⁹ 2YER,⁴⁹ 2YDI,⁷⁰ 2YM7.⁷¹ Dichas estructuras fueron seleccionadas en base a la resolución del cristal ($R < 1,8$ Å).

Durante la preparación de la proteína los iones y el solvente de cristalización fueron removidos. Los estados de ionización y las posiciones de los átomos de hidrógeno fueron asignados con Protonate-3D,⁷² implementado en MOE 2014.09.¹⁶ Luego, las estructuras fueron minimizadas con el campo de fuerzas Amber99,⁷³ manteniendo fijos los átomos pesados. Finalmente, el ligando y las moléculas de agua fueron removidas y se calcularon las cargas parciales de la proteína con Amber99.

Los ligandos co-cristalizados fueron extraídos del correspondiente complejo cristalográfico, se le agregaron los átomos de hidrógeno, se le asignaron los estados de protonación a pH 7,4 y se calcularon las cargas parciales con PM3/ESP. Además, para evitar preferencias provenientes de la conformación inicial (*input*) del ligando, las estructuras fueron minimizadas con Open Babel,⁷⁴ utilizando gradiente conjugado (con un máximo de 2500 pasos para alcanzar el criterio de convergencia) y el campo de fuerzas MMFF94.⁷⁵

Finalmente, los valores de RMSD de cada pose de *docking* con respecto a los ligandos co-cristalizados originales fueron calculados mediante un *script* en *Python* utilizando la siguiente ecuación:

$$RMSD(\mathbf{a}, \mathbf{b}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n ((a_{ix} - b_{ix})^2 + (a_{iy} - b_{iy})^2 + (a_{iz} - b_{iz})^2)}$$

donde n representan los átomos pesados en las estructuras \mathbf{a} y \mathbf{b} .

4.7.3. Simulaciones de *docking* con *Gold 5.2*

Las simulaciones de *docking* fueron realizadas con el programa GOLD 5.2,¹⁵ utilizando *goldscore* como *scoring function*. La configuración de los parámetros de *docking* al igual que la preparación de la proteína fueron realizados del mismo modo que en *DockBench 1.0*.

La estructura de la proteína de código 1ZYS fue descargada de la base de datos *RCSB Protein Data Bank*⁶⁰ y la misma fue seleccionada en base a los resultados obtenidos con *DockBench 1.0*.⁵⁵

Los ligandos fueron preparados con MOE 2014.09,¹⁶ utilizando el campo de fuerzas MMFF94 para la minimización y las cargas parciales fueron calculadas con PM3/ESP.

Para el análisis de los resultados se utilizaron diversos *scripts* (*Python*, *Bash*, *SVL*) desarrollados en el grupo del Prof. Stefano Moro que permitieron calcular las energías de Van der Waals, electrostática, interacciones hidrofóbicas, etc. Para graficar los resultados se utilizó Gnuplot 4.6,⁶¹ y para la visualización de los mismos MOE 2014.09¹⁶ y VMD 1.9.2.⁷⁶

4.7.4. Simulaciones de dinámica molecular *post-docking* y utilizando *SuMD*

Todos los cálculos computacionales fueron realizadas en un sistema informático híbrido CPU/GPU, utilizando el

cluster diseñado por Acellera⁷⁷ con 4 NVIDIA GTX 580 y 2 NVIDIA GTX 680 GPU para las simulaciones de DM.

El análisis de las trayectorias, imágenes y videos fueron realizados con funcionalidades implementadas en VMD 1.9.2,⁷⁶ WORDOM,⁷⁸ PyMOL 1.5.0.4⁷⁹ y Gnuplot 4.6.⁶¹

Las energías de interacción ligando-receptor fueron calculadas extrapolando los términos de interacciones de no-enlace en el campo de fuerzas Amberff14SB,⁸⁰ usando NAMD.⁸¹

Las simulaciones de DM fueron llevadas a cabo con el programa ACEMD,²⁵ usando el campo de fuerzas Amberff14SB y condiciones periódicas de contorno.

En las DM *post-docking* se utilizó la pose de *docking* del ligando PQ (obtenida en el estudio previo con GOLD 5.2) o la conformación del ligando co-cristalizado en el caso de la referencia YEX y se calcularon las cargas RESP⁷³ con Gaussian09⁸² (a nivel HF/6-31G*). Mientras que para las simulaciones de SuMD la pose de *docking* o cristalográfica de los ligandos fueron optimizadas con MOPAC⁸³ a nivel PM6 y luego las cargas RESP fueron calculadas con Gaussian09. Posteriormente, el ligando fue ubicado a ~30 Å del sitio de unión del ATP en la Chk1 (código PDB: 1ZYS) y además se definió el centro de masa de esta cavidad para poder calcular la distancia ligando-receptor ($d_{cm_{L-R}}$) utilizada por el algoritmo de SuMD.

Tanto la proteína como el ligando fueron preparados con Antechamber⁸⁴ para crear el archivo que contiene la información acerca de la estructura, topología y parámetros necesarios para la DM (.prmtop), utilizando el campo de fuerzas Amber14ffSB combinado con GAFF para los parámetros del ligando.

El sistema fue solvatado con el modelo de solvente TIP3P⁸⁵ usando el programa Solvate 1.0⁸⁶ y neutralizados con iones Na⁺/Cl⁻ hasta una concentración final de 0,154 M.

En una primera etapa el sistema fue equilibrado por 1 ns para permitir la difusión de las moléculas de agua e iones a la cavidad de *binding*, manteniendo proteína y ligando inmóviles en un ensamble NPT, fijando la temperatura a 300 K utilizando un termostato de Langevin y la presión a 1,01 atm usando un baróstato de Berendsen. En una segunda etapa, el sistema fue equilibrado nuevamente por 1 ns en un ensamble NPT, manteniendo fijo el *backbone* y permitiendo el movimiento de moléculas de agua, iones y cadenas laterales de la proteína.

Finalmente, se quitaron todas las restricciones permitiendo el movimiento del sistema completo y se realizaron simulaciones de DM en un ensamble NVT a 300 K. Las simulaciones post-docking fueron de 100 ns, mientras que las simulaciones de SuMD fueron dependientes del tiempo requerido por cada ligando para acercarse al sitio de *binding* (~18-36 ns) y se realizaron tres réplicas de cada uno.

4.7.5. Ensayos de actividad en la quinasa Chk1

La medición de actividad en la quinasa Chk1 se realizó mediante un ensayo radiométrico (³³PanQinase® Activity Assay) utilizando microplacas de 96 pocillos en un volumen de reacción de 50 µL. La mezcla de reacción fue preparada adicionando: 10 µL de solución acuosa de ATP no radioactivo (1 µM), 25 µL de mezcla de *buffer* de reacción/ [γ-³³P]-ATP, 5 µL de la muestra a medir en 10 % DMSO y 10 µL de mezcla enzima (25ng/50µL)/sustrato (2µg/50µL). La composición del *buffer* de reacción fue: 70 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 µM Na-ortovanadato, 1.2 mM DTT y ~8 x 10⁵ cpm por pocillo de [γ-³³P]-ATP.

Las proteínas Chk1 utilizadas por ProQinase fueron producidas a partir de ADNc humano y expresadas en células de insecto Sf9 como proteína recombinante marcadas con una cola de histidina, ya sea la proteína entera o solo el fragmento activo. Las mismas fueron purificadas por cromatografía de afinidad con Ni²⁺ inmovilizado y su pureza fue examinada por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y posterior tinción con azul de *Coomassie*, y su identidad controlada por espectrometría de masas.

Las mezclas de reacción fueron incubadas a 30 °C durante 60 minutos, luego se adicionaron 50 µL de solución de H₃PO₄ 2 % (V/V) para frenar la reacción. Las microplacas fueron lavadas dos veces con 200 µL de solución de NaCl 0,9 % (P/V). La incorporación de ³³P_i fue determinado con un contador de centelleo (Microbeta, Wallac).

Todos los ensayos fueron realizados con un sistema robotizado BeckmanCoulter Biomek 2000/SL.

Para cada ensayo, el valor medio de cpm de tres pocillos con la mezcla de reacción completa, pero sin la quinasa, fue definido como “**control negativo**”. Este valor refleja el *binding* inespecífico de radioactividad a la placa en ausencia de la proteína pero en presencia del sustrato. Además, para cada ensayo el valor medio de cpm de otros tres pocillos con la mezcla de reacción completa, pero sin el compuesto, fue

definido como “**control positivo**”; esto es, la actividad normal de la quinasa en ausencia del inhibidor. La diferencia entre el control positivo y negativo fue tomada como el 100 % de actividad de la proteína.

Para la evaluación de los resultados el valor del control negativo fue sustraído del valor del control positivo como así también del correspondiente valor de cada compuesto. La actividad residual de la Chk1 en presencia de cada inhibidor fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Act. res. (\%)} = \frac{(\text{cpm del compuesto} - \text{control negativo})}{(\text{control positivo} - \text{control negativo})} \times 100$$

4.8. Conclusiones

El desarrollo de la plataforma informática **DockBench 1.0** permitió confrontar protocolos de *docking* y estructuras cristalográficas de la proteína de manera automatizada. Esta herramienta ha resultado de utilidad para seleccionar la mejor combinación algoritmo de búsqueda/*scoring function* entre 17 posibles protocolos, utilizando programas como Autodock, Molegro, Glide, GOLD, PLANTS y rDock entre otros. Luego de realizar el estudio de *benchmark* utilizando **DockBench 1.0** se observó que AUTODOCK-lga y GOLD-goldscore fueron los dos protocolos que mejor reprodujeron la pose cristalográfica en diferentes proteínas.

Si bien en los ensayos preliminares con Autodock 4.0 se empleó el protocolo AUTODOCK-lga, éste fue utilizado con la proteína de código 1ZLT la cual, según los estudios posteriores de *benchmark*, no es la más apropiada para realizar las simulaciones de *docking*. Sin embargo, los resultados obtenidos con Autodock 4.0 fueron útiles para reconocer el sitio activo e identificar las principales interacciones a ser analizadas en las simulaciones computacionales posteriores.

Como se mencionó previamente, GOLD-goldscore fue uno de los mejores protocolos de *docking*, el cual puede ser utilizado con las proteínas de código: 1ZYS, 4HYI, 2HY0, 3PA5 y 1NVS. En esta tesis, el protocolo **GOLD-goldscore** en combinación con la proteína de código 1ZYS fue seleccionado para el estudio de *docking* de **PQd** en la quinasa Chk1. Se encontró que, principalmente las pirazoloquinolinonas que presentan sustituyentes halógenos tanto en el anillo de quinolona como en el fenilo unido al anillo pirazolona (**PQd 001-010**), fueron las que presentaron mejores

interacciones hidrofóbicas con Leu15, Tyr20, Val23, Lys38, Leu84, Tyr86 y Leu137 y electrostáticas con Glu85 y Cys87. En particular, el tautómero ceto de **PQd** presentó un modo de unión en el sitio activo que permite la formación de puente de hidrógeno entre el carbonilo del anillo pirazolona y el grupo amino del *backbone* de Cys87, mientras que las **PQd** en su forma enol exhibieron un modo de unión diferente, el cual permite la interacción de puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del anillo pirazolona y el carbonilo de Glu85.

Posteriormente, a partir de los resultados de *docking* se seleccionaron los tres compuestos más representativos para realizar un estudio comparativo mediante simulaciones de DM. En primer lugar se seleccionó **PQd 001**, por ser una de las pirazoloquinolinonas que presentaba mejor perfil energético; en el extremo opuesto se escogió **PQd 240**, por sus interacciones muy desfavorables con los residuos del sitio activo y, finalmente, un inhibidor muy potente de Chk1 ($IC_{50} = 0,1$ nM) el cual fue tomado como referencia (**YEX**).

En las simulaciones *post-docking* se observó que **PQd 001_ceto** cambió su posición ~ 5 Å respecto a su pose de *docking* y su energía de interacción con la proteína en esta orientación fue menos favorable que la inicial. Por su parte, **PQd 001_enol** fue más estable en su posición inicial respecto al tautómero ceto. Se encontró además que el tautómero enol emula al compuesto de referencia **YEX** en su perfil de RMSD, aunque este último presentó mejor energía de interacción con la proteína.

Mediante simulaciones de **SuMD** se estudió el proceso de reconocimiento ligando-receptor observándose dos zonas de ingreso al sitio de unión del ATP: una de ellas fue entre el *loop* de activación y el final de la lámina $\beta 1$, por donde lo hicieron **YEX** y **PQd 001**, siendo Leu15 y Glu91 los residuos claves que definieron el ingreso al sitio; la otra zona se encontró entre el inicio de la lámina $\beta 1$ y el final de la $\beta 2$, en cuyo caso los residuos esenciales que permitieron el ingreso de **PQd 240** fueron Leu15 y Tyr86. Cabe destacar que, en general, las interacciones principales dentro del sitio activo se produjeron con los residuos: Leu15, Gly16, Glu17, Val23, Ala36, Lys38, Leu84, Tyr86, Glu85, Cys87, Ser88, Glu91, Leu137, Ser147 y Asp148, independientemente de la zona por la cual ingrese el ligando. En cuanto a las interacciones de hidrógeno, estas difieren respecto a las mencionadas anteriormente para los resultados de *docking*. El ligando de referencia **YEX** formó un puente de hidrógeno con Cys87 y

Glu91, pero no presentó interacciones de este tipo con Glu85 como se observa en su estructura cristalográfica; mientras que el ligando **PQd 001** presentó un puente de hidrógeno con Asp148 en lugar de Cys87. Las diferencias observadas se deben a que la pose final de SuMD presentó una orientación diferente a la calculada con *docking*.

Finalmente, las simulaciones computacionales estimaban que los anillos de pirazoloquinolinonas eran promisorios inhibidores de Chk1, ya que presentaban interacciones similares al ligando de referencia en el sitio activo. Sin embargo, el ensayo *in vitro* de actividad de las **PQ** seleccionadas mostró que las mismas no presentan la actividad inhibitoria esperada. Luego de dichos resultados, un análisis más exhaustivo de los cálculos computacionales demostró que las interacciones electrostáticas y principalmente la formación de puentes de hidrógeno, serían fundamentales para la unión efectiva de estos ligandos. Por lo tanto, las interacciones electrostáticas débiles de los compuestos de interés con la proteína podrían ser una de las causas de su inactividad entre otros factores.

4.9.

Referencias bibliográficas

- (1) Makriyannis, A.; Biegel, D. *Drug Discovery Strategies and Methods*; CRC Press: New York, USA, 2003.
- (2) Cirilo, A. D.; Llombart, C. M.; Tamargo, J. J. *Introducción a la Química Terapéutica*; Ediciones Díaz de Santos: Madrid, España, 2003.
- (3) Silverman, R. B.; Holladay, M. W. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Academic Press: San Diego, USA, 2014.
- (4) Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chichester, England ; Hoboken, NJ, 2007.
- (5) Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, 2nd edition.; Wiley: Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2004.
- (6) Bultinck, P.; Winter, H. D.; Langenaeker, W.; Tollenare, J. P. *Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery*; CRC Press, 2003.
- (7) Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S.; Weiner, P. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (3), 765–784.
- (8) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (19), 5179–5197.

- (9) Karplus, M.; others. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comput Chem* **1983**, *4*, 187217.
- (10) Böhm, H.-J. Prediction of Binding Constants of Protein Ligands: A Fast Method for the Prioritization of Hits Obtained from de Novo Design or 3D Database Search Programs. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, *12* (4), 309–309.
- (11) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791.
- (12) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, NA – NA.
- (13) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739–1749.
- (14) Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1750–1759.
- (15) *GOLD Suite, Version 5.2*; Cambridge Crystallographic Data Centre: 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK.
- (16) *Molecular Operating Environment (MOE), 2014.09*; Chemical Computing Group Inc.: 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2015.
- (17) Korb, O.; Stützle, T.; Exner, T. E. Plants: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design. In *Ant Colony Optimization and Swarm Intelligence*; Dorigo, M., Gambardella, L.M., Birattari, M., Martinoli, A., Poli, R., Stützle, T., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, Alemania, 2006; Vol. 4150, pp 247–258.
- (18) Korb, O.; Stützle, T.; Exner, T. E. An Ant Colony Optimization Approach to Flexible Protein–ligand Docking. *Swarm Intell.* **2007**, *1* (2), 115–134.
- (19) Ruiz-Carmona, S.; Alvarez-Garcia, D.; Foloppe, N.; Garmendia-Doval, A. B.; Juhos, S.; Schmidtke, P.; Barril, X.; Hubbard, R. E.; Morley, S. D. rDock: A Fast, Versatile and Open Source Program for Docking Ligands to Proteins and Nucleic Acids. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10* (4), e1003571.
- (20) Horvath, D. Pharmacophore-Based Virtual Screening. In *Cheminformatics and Computational Chemical Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; pp 261–298.
- (21) Leach, A. R.; Shoichet, B. K.; Peishoff, C. E. Prediction of Protein–Ligand Interactions. Docking and Scoring: Successes and Gaps. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (20), 5851–5855.
- (22) Warren, G. L.; Andrews, C. W.; Capelli, A.-M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; et al. A Critical Assessment of Docking

- Programs and Scoring Functions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (20), 5912–5931.
- (23) McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of Folded Proteins. *Nature* **1977**, *267*, 585–590.
- (24) Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Prentice Hall, 2001.
- (25) Harvey, M. J.; Giupponi, G.; Fabritiis, G. D. ACEMD: Accelerating Biomolecular Dynamics in the Microsecond Time Scale. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5* (6), 1632–1639.
- (26) Harvey, M. J.; De Fabritiis, G. High-Throughput Molecular Dynamics: The Powerful New Tool for Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (19-20), 1059–1062.
- (27) Shaw, D. E.; Dror, R. O.; Salmon, J. K.; Grossman, J. P.; Mackenzie, K. M.; Bank, J. A.; Young, C.; Deneroff, M. M.; Batson, B.; Bowers, K. J.; et al. Millisecond-Scale Molecular Dynamics Simulations on Anton. In *Proceedings of the Conference on High Performance Computing Networking, Storage and Analysis*; Portland, Oregon, USA, 2009; pp 1–11.
- (28) Ohmura, I.; Morimoto, G.; Ohno, Y.; Hasegawa, A.; Taiji, M. MDGRAPE-4: A Special-Purpose Computer System for Molecular Dynamics Simulations. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2014**, *372* (2021), 20130387–20130387.
- (29) Durrant, J. D.; McCammon, J. A. Molecular Dynamics Simulations and Drug Discovery. *BMC Biol.* **2011**, *9* (1), 71.
- (30) Borhani, D. W.; Shaw, D. E. The Future of Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26* (1), 15–26.
- (31) Stanley, N.; De Fabritiis, G. High Throughput Molecular Dynamics for Drug Discovery. *Silico Pharmacol.* **2015**, *3*, 1-4.
- (32) Terapias dirigidas contra el cáncer <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida/hoja-informativa-terapias-dirigidas> (accessed Jul 21, 2015).
- (33) Goto, H.; Kasahara, K.; Inagaki, M. Novel Insights into Chk1 Regulation by Phosphorylation. *Cell Struct. Funct.* **2015**, *40*, 43–50.
- (34) Brnardic, E. J.; Garbaccio, R. M.; Fraley, M. E.; Tasber, E. S.; Steen, J. T.; Arrington, K. L.; Dudkin, V. Y.; Hartman, G. D.; Stirdivant, S. M.; Drakas, B. A.; et al. Optimization of a Pyrazoloquinolinone Class of Chk1 Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (21), 5989–5994.
- (35) Ashwell, S.; Janetka, J. W.; Zabludoff, S. Keeping Checkpoint Kinases in Line: New Selective Inhibitors in Clinical Trials. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2008**, *17* (9), 1331–1340.
- (36) Prudhomme, M. Novel Checkpoint 1 Inhibitors. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2006**, *1* (1), 55–68.
- (37) Chen, P.; Luo, C.; Deng, Y.; Ryan, K.; Register, J.; Margosiak, S.; Tempczyk-Russell, A.; Nguyen, B.; Myers, P.; Lundgren, K.; et al. The 1.7 Å Crystal Structure of Human Cell Cycle Checkpoint Kinase Chk1: Implications for Chk1 Regulations. *Cell* **2000**, *100*, 681–692.
- (38) Zhao, B.; Bower, M. J.; McDevitt, P. J.; Zhao, H.; Davis, S. T.; Johanson, K. O.; Green, S. M.; Concha, N. O.; Zhou, B.-B. S. Structural Basis for Chk1 Inhibition by UCN-01. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (48), 46609–46615.

- (39) Gavrin, L. K.; Saiah, E. Approaches to Discover Non-ATP Site Kinase Inhibitors. *Med Chem Commun* **2013**, *4* (1), 41–51.
- (40) Wang, Q.; Fan, S.; Eastman, A.; Worland, P. J.; Sausville, E. A.; O'Connor, P. M. UCN-01: A Potent Abrogator of G2 Checkpoint Function in Cancer Cells with Disrupted p53. *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88* (14), 956–965.
- (41) Graves, P. R.; Yu, L.; Schwarz, J. K.; Gales, J.; Sausville, E. A.; O'Connor, P. M.; Piwnica-Worms, H. The Chk1 Protein Kinase and the Cdc25C Regulatory Pathways Are Targets of the Anticancer Agent UCN-01. *J. Biological Chem.* **2000**, *275* (8), 5600–5605.
- (42) Dai, Y.; Grant, S. New Insights into Checkpoint Kinase 1 in the DNA Damage Response Signaling Network. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16* (2), 376–383.
- (43) Zabludoff, S. D.; Deng, C.; Grondine, M. R.; Sheehy, A. M.; Ashwell, S.; Caleb, B. L.; Green, S.; Haye, H. R.; Horn, C. L.; Janetka, J. W.; et al. AZD7762, a Novel Checkpoint Kinase Inhibitor, Drives Checkpoint Abrogation and Potentiates DNA-Targeted Therapies. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7* (9), 2955–2966.
- (44) Daud, A.; Springett, G. M.; Mendelson, D. S.; Munster, P. N.; Goldman, J. W.; Strosberg, J. R.; Kato, G.; Nesheiwat, T.; Isaacs, R.; Rosen, L. S. A Phase I Dose-Escalation Study of SCH 900776, a Selective Inhibitor of Checkpoint Kinase 1 (CHK1), in Combination with Gemcitabine (Gem) in Subjects with Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28* (15), (suppl; abstr 3064).
- (45) Daud, A. I.; Ashworth, M. T.; Strosberg, J.; Goldman, J. W.; Mendelson, D.; Springett, G.; Venook, A. P.; Loechner, S.; Rosen, L. S.; Shanahan, F.; et al. Phase I Dose-Escalation Trial of Checkpoint Kinase 1 Inhibitor MK-8776 As Monotherapy and in Combination With Gemcitabine in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33* (9), 1060-1066.
- (46) NIH - National Cancer Institute <http://www.cancer.gov/> (accessed Jul 23, 2015).
- (47) Clinical Trials <https://www.clinicaltrials.gov/> (accessed Jul 23, 2015).
- (48) Lv, M.; Ma, S.; Tian, Y.; Zhang, X.; Lv, W.; Zhai, H. Computational Studies on the Binding Mechanism between Triazolone Inhibitors and Chk1 by Molecular Docking and Molecular Dynamics. *Mol. Bio. Syst.* **2015**, *11* (1), 275–286.
- (49) Oza, V.; Ashwell, S.; Brassil, P.; Breed, J.; Ezhuthachan, J.; Deng, C.; Grondine, M.; Horn, C.; Liu, D.; Lyne, P.; et al. Synthesis and Evaluation of Triazolones as Checkpoint Kinase 1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (6), 2330–2337.
- (50) Kumar, V.; Khan, S.; Gupta, P.; Rastogi, N.; Mishra, D. P.; Ahmed, S.; Siddiqi, M. I. Identification of Novel Inhibitors of Human Chk1 Using Pharmacophore-Based Virtual Screening and Their Evaluation as Potential Anti-Cancer Agents. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2014**, *28* (12), 1247–1256.
- (51) Ambre, P. K.; Pissurlenkar, R. R. S.; Coutinho, E. C.; Iyer, R. P. Identification of New Checkpoint Kinase-1 (Chk1) Inhibitors by Docking, 3D-QSAR, and Pharmacophore-Modeling Methods. *Can. J. Chem.* **2012**, *90* (8), 675–692.

- (52) Converso, A.; Hartingh, T.; Garbaccio, R. M.; Tasber, E.; Rickert, K.; Fraley, M. E.; Yan, Y.; Kreatsoulas, C.; Stirdivant, S.; Drakas, B.; et al. Development of Thioquinazolinones, Allosteric Chk1 Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (4), 1240–1244.
- (53) Vanderpool, D.; Johnson, T. O.; Ping, C.; Bergqvist, S.; Alton, G.; Phonophaly, S.; Rui, E.; Luo, C.; Deng, Y.-L.; Grant, S.; et al. Characterization of the CHK1 Allosteric Inhibitor Binding Site. *Biochemistry (Mosc.)* **2009**, *48* (41), 9823–9830.
- (54) Ciancetta, A.; Cuzzolin, A.; Moro, S. Alternative Quality Assessment Strategy to Compare Performances of GPCR-Ligand Docking Protocols: The Human Adenosine A_{2A} Receptor as a Case Study. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (8), 2243–2254.
- (55) Cuzzolin, A.; Sturlese, M.; Malvacio, I.; Ciancetta, A.; Moro, S. DockBench: An Integrated Informatic Platform Bridging the Gap between the Robust Validation of Docking Protocols and Virtual Screening Simulations. *Molecules* **2015**, *20* (6), 9977–9993.
- (56) Ferreira, V. F.; Leal, K. Z.; Lindgren, E. B.; De Oliveira, M. R. P.; De Souza, M. C. B. V.; Vasconcelos, T. R. A.; Wardell, J. L.; Wardell, S. M. S. V.; Yoneda, J. D. Structural Evaluation of Three 2-phenylpyrazolo[4,3-*c*]quinolin-3-one Monohydrates. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1051*, 299–309.
- (57) Katritzky, A. R.; Hall, C. D.; El-Gendy, B. E.-D. M.; Draghici, B. Tautomerism in Drug Discovery. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2010**, *24* (6-7), 475–484.
- (58) Deng, Z.; Chuaqui, C.; Singh, J. Structural Interaction Fingerprint (SIFt): A Novel Method for Analyzing Three-Dimensional Protein–Ligand Binding Interactions. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (2), 337–344.
- (59) Sabbadin, D.; Moro, S. Supervised Molecular Dynamics (SuMD) as a Helpful Tool To Depict GPCR–Ligand Recognition Pathway in a Nanosecond Time Scale. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (2), 372–376.
- (60) RCSB Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (accessed Jul 25, 2015).
- (61) Gnuplot homepage <http://www.gnuplot.info/> (accessed Jul 25, 2015).
- (62) Dudkin, V. Y.; Rickert, K.; Kreatsoulas, C.; Wang, C.; Arrington, K. L.; Fraley, M. E.; Hartman, G. D.; Yan, Y.; Ikuta, M.; Stirdivant, S. M.; et al. Pyridyl Aminothiazoles as Potent Inhibitors of Chk1 with Slow Dissociation Rates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (7), 2609–2612.
- (63) Stavenger, R. A.; Zhao, B.; Zhou, B.-B. S.; Brown, M. J.; Lee, D.; Holt, D. A. Pyrrolo[2,3-*b*]pyridines Inhibit the Checkpoint Kinase Chk1. *To be Published* **2005**.
- (64) Huang, X.; Cheng, C. C.; Fischmann, T. O.; Duca, J. S.; Richards, M.; Tadikonda, P. K.; Reddy, P. A.; Zhao, L.; Arshad Siddiqui, M.; Parry, D.; et al. Structure-Based Design and Optimization of 2-aminothiazole-4-carboxamide as a New Class of CHK1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2590–2594.
- (65) Labroli, M.; Paruch, K.; Dwyer, M. P.; Alvarez, C.; Keertikar, K.; Poker, C.; Rossman, R.; Duca, J. S.; Fischmann, T. O.; Madison, V.; et al. Discovery of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-

- Based CHK1 Inhibitors: A Template-Based Approach. Part 2. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2011**, *21*, 471–474.
- (66) Huang, S.; Garbaccio, R. M.; Fraley, M. E.; Steen, J.; Kretsoulas, C.; Hartman, G.; Stirdivant, S.; Drakas, B.; Rickert, K.; Walsh, E.; et al. Development of 6-Substituted Indolylquinolinones as Potent Chk1 Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (22), 5907–5912.
- (67) Zhao, L.; Zhang, Y.; Dai, C.; Guzi, T.; Wiswell, D.; Seghezzi, W.; Parry, D.; Fischmann, T.; Siddiqui, M. A. Design, Synthesis and SAR of Thienopyridines as Potent CHK1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7216–7221.
- (68) Lee, C. C.; Ng, K.; Wan, Y.; Gray, N.; Spraggon, G. Crystal Structure of Chk1 Complexed with a Hymenaldisine Analog. *To be Published* **2005**.
- (69) Dwyer, M. P.; Paruch, K.; Labroli, M.; Alvarez, C.; Keertikar, K. M.; Poker, C.; Rossman, R.; Fischmann, T. O.; Duca, J. S.; Madison, V.; et al. Discovery of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-Based CHK1 Inhibitors: A Template-Based Approach. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (1), 467–470.
- (70) Oza, V.; Ashwell, S.; Almeida, L.; Brassil, P.; Breed, J.; Deng, C.; Gero, T.; Grondine, M.; Horn, C.; Ioannidis, S.; et al. Discovery of Checkpoint Kinase Inhibitor (*S*)-5-(3-fluorophenyl)-*N*-(piperidin-3-yl)-3-ureidothiophene-2-carboxamide (AZD7762) by Structure-Based Design and Optimization of Thiophenecarboxamide Ureas. *J.Med.Chem.* **2012**, *55* (11), 5130–5142.
- (71) Reader, J. C.; Matthews, T. P.; Klair, S.; Cheung, K.-M. J.; Scanlon, J.; Proisy, N.; Addison, G.; Ellard, J.; Piton, N.; Taylor, S.; et al. Structure-Guided Evolution of Potent and Selective CHK1 Inhibitors through Scaffold Morphing. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (24), 8328–8342.
- (72) Labute, P. Protonate3D: Assignment of Ionization States and Hydrogen Coordinates to Macromolecular Structures. *Proteins* **2009**, *75* (1), 187–205.
- (73) Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. How Well Does a Restrained Electrostatic Potential (RESP) Model Perform in Calculating Conformational Energies of Organic and Biological Molecules? *J. Comput. Chem.* **2000**, *21* (12), 1049–1074.
- (74) O'Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An Open Chemical Toolbox. *J Cheminf* **2011**, *3*, 33.
- (75) Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17* (5-6), 490–519.
- (76) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- (77) Acellera <http://www.acellera.com/>.
- (78) Seeber, M.; Felling, A.; Raimondi, F.; Muff, S.; Friedman, R.; Rao, F.; Caflisch, A.; Fanelli, F. Wordom: A User-Friendly Program for the Analysis of Molecular Structures, Trajectories, and Free Energy Surfaces. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (6), 1183–1194.
- (79) PyMOL | www.pymol.org <https://www.pymol.org/> (accessed Jul 31, 2015).

- (80) The Amber Molecular Dynamics Package/ Force Field <http://ambermd.org/#ff> (accessed Aug 1, 2015).
- (81) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1781–1802.
- (82) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09, Revision B.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2010.
- (83) Stewart Computational Chemistry - MOPAC Home Page <http://openmopac.net/> (accessed Aug 1, 2015).
- (84) Antechamber package <http://ambermd.org/antechamber/ac.html> (accessed Aug 1, 2015).
- (85) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935.
- (86) Helmut Grubmüller and Volker Groll. Solvate <http://www.mpibpc.mpg.de/home/grubmueller/downloads/solvate/index.html>.



***Conclusiones generales y
proyecciones***

En este trabajo de tesis doctoral se ha expuesto el estudio teórico-experimental de estructuras conteniendo el núcleo de quinolona.

Inicialmente, se optimizaron las condiciones para la síntesis asistida por irradiación de microondas de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (**Q**), consiguiendo realizar la reacción en un solo paso, además de disminuir los tiempos de la misma, de horas a minutos, respecto a la síntesis convencional de estos núcleos. Empleando las metodologías convencional y alternativa, se sintetizaron un total de trece compuestos quinolin-4-onas (**Q1-13**), con rendimientos moderados a excelentes (32-87 %).

Posteriormente, mediante hidrólisis en medio básico de 3-carboetoxi-quinolin-4-onas y aplicando nuevamente microondas, se obtuvieron nueve derivados de 3-carboxi-quinolin-4-onas (**Q14-22**), con rendimientos muy buenos a excelentes (75-97 %). Además, se sintetizaron cuatro núcleos de 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas (**Q23-26**) con rendimientos moderados a excelentes (44-99 %).

Por primera vez, se sintetizaron 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (**Q**) mediante termólisis en fase gaseosa (FVP) de fenilaminometilenmalonatos de dietilo (**M**). Aunque esta alternativa no fue útil como metodología sintética debido a los bajos rendimientos (5-44 %), comparados con la síntesis en solución, el estudio experimental de FVP aportó datos novedosos y fundamentales para revelar el mecanismo de formación de quinolin-4-onas en fase gaseosa. En primer lugar, se obtuvo una mezcla de productos entre los que se encontraban principalmente **Q** y el producto descarboxilado quinolin-4-ona (**Q'**). En segundo lugar, se detectó 3-(fenilamino)acrilato de etilo (**FA**) como intermediario de reacción, indicando ciertamente que la descarboxilación para generar **Q'** se produce antes de la formación del anillo de quinolin-4-ona. Cabe destacar que, este estudio es el primer ejemplo de descarboxilación de compuestos carboxílicos como malonatos de dietilo en fase gaseosa a temperaturas menores a 500 °C.

Mediante cálculos computacionales a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) y CCSD(T)/6-311G(d,p), se propusieron los mecanismos que conducirían tanto a la formación **Q** como de **Q'** (*vía A* y *vía B* respectivamente). Según el mecanismo propuesto, una vez formado **M**, éste podría perder una molécula de etanol, continuando así hacia la formación de **Q**; o bien, liberar eteno y CO₂ seguido de la

pérdida de etanol dando el producto **Q'**. En ambos casos, la eliminación de moléculas pequeñas daría lugar a un intermediario iminocetena (**A-V** o **B-VI**), similar al descrito previamente en la FVP de ácidos de Meldrum. Dicha cetena podría ciclar hacia un intermediario tipo quinolona (**A-VII** o **B-VIII**), el cual posteriormente podría tautomerizar al producto final mediante dos migraciones de hidrógeno consecutivas [1,2] y [1,4]. Sorprendentemente, los estados de transición de mayor energía involucran las transposiciones de protón que podrían comprender la zona determinante de la velocidad de la reacción en fase gaseosa. Es importante destacar que, la caracterización de estos estados de alta energía, no había sido reportada hasta el momento.

La segunda parte de esta tesis, estuvo motivada por el descubrimiento de nuevos inhibidores de la enzima Chk1, utilizados actualmente como complemento de terapias oncogénicas. Por tal motivo, se sintetizaron treinta derivados de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas (**PQ1-30**), obteniéndose rendimientos pobres a excelentes (15-90 %). En algunos casos, los rendimientos fueron mejores empleando irradiación de microondas, mientras que otras veces el calentamiento convencional arrojó mejores resultados.

Mediante simulaciones preliminares con Autodock 4.0 se reconoció el sitio activo de la enzima Chk1 y se identificaron las principales interacciones con los residuos de la proteína.

Luego, en el marco de una estadía de investigación en el grupo del Profesor Stefano Moro, de la Universidad de Padova, Italia, se desarrolló la plataforma informática **DockBench 1.0**, la cual permite confrontar protocolos de *docking* y estructuras cristalográficas de proteínas de manera automatizada. Utilizando esta herramienta, se seleccionó el protocolo más óptimo (**GOLD-goldscore**) para realizar las simulaciones de *docking*, junto con la proteína que mejor reprodujo la pose cristalográfica del ligando (1ZYS).

Los compuestos pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas (**PQd**) presentaron interacciones hidrofóbicas con los residuos Leu15, Tyr20, Val23, Lys38, Leu84, Tyr86 y Leu137, e interacciones electrostáticas con Glu85 y Cys87, residuos con los cuales algunas **PQd** establecieron interacciones de puente de hidrógeno en el sitio activo de Chk1.

A partir de los resultados de *docking* se seleccionaron las estructuras más adecuadas para las simulaciones de dinámica molecular. Para ello, se consideró un ligando con interacciones muy favorables (**PQd 001**), en el extremo

opuesto, un ligando con interacciones muy desfavorables con los residuos del sitio activo (**PQd 240**) y, un compuesto de referencia con actividad inhibitoria de Chk1 (**YEX**, 8-(pirrol-2-il)-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinolin-1-ona).

En las simulaciones de dinámica molecular *post-docking* se observó que **PQd 001** en su forma ceto, cambió su posición ~ 5 Å respecto a su pose de *docking* y su energía de interacción con la proteína, en esta orientación, fue menos favorable que la inicial. Por su parte, el tautómero enol de **PQd 001** fue más estable en su posición inicial respecto al tautómero ceto. Se encontró además, que el tautómero enol emula al compuesto de referencia **YEX** en su perfil de RMSD, aunque este último presentó mejor energía de interacción con la proteína.

Mediante simulaciones de dinámica molecular supervisada (**SuMD**) se estudió el proceso de reconocimiento ligando-receptor, observándose dos zonas de ingreso al sitio de unión del ATP. Una de las zonas es por donde ingresaron los compuestos **YEX** y **PQd 001** (ceto), siendo Leu15 y Glu91 los residuos claves que definieron el ingreso al sitio. Por su parte, **PQd 240**, se introdujo en el sitio activo por una zona diferente, en cuyo caso los residuos esenciales fueron Leu15 y Tyr86. Cabe destacar que, en general, las interacciones principales dentro del sitio activo se produjeron con los residuos: Leu15, Gly16, Glu17, Val23, Ala36, Lys38, Leu84, Tyr86, Glu85, Cys87, Ser88, Glu91, Leu137, Ser147 y Asp148, independientemente de la zona por la cual haya ingresado el ligando. En cuanto a las interacciones por puente de hidrógeno, el ligando de referencia **YEX** estableció este tipo de interacciones con Cys87 y Glu91, pero no con Glu85 como se había observado en su estructura cristalográfica; mientras que el ligando **PQd 001** presentó un puente de hidrógeno con Asp148 en lugar de Cys87, como se había observado en los estudios de *docking*.

Finalmente, a diferencia de lo esperado según las simulaciones computacionales, los resultados de los ensayos *in vitro* de actividad inhibitoria de Chk1 por parte de las **PQ**, demostraron que las mismas no presentan la actividad inhibitoria esperada. Aparentemente, las interacciones electrostáticas y principalmente la formación de puentes de hidrógeno, serían fundamentales para la unión efectiva de estos ligandos.

Aprovechando la experiencia adquirida durante estos años en cuanto a metodologías sintéticas de estructuras

conteniendo el núcleo de quinolona, además del conocimiento de la estructura del sitio activo de la Chk1, surge como proyección general de esta tesis el desafío de encontrar nuevos inhibidores de Chk1, mediante modificación estructural de pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas.

En primer lugar, se plantea un análisis, mediante modelado computacional, del efecto de los sustituyentes, principalmente en posiciones 4, 5 y 8 del núcleo de pirazoloquinolinona en la interacción con los residuos del sitio activo de la proteína. Este estudio, deriva de la observación de los inhibidores de Chk1 encontrados en bibliografía que contienen estructuras similares a pirazolo[4,3-*c*]quinolin-3-onas, los cuales presentan diferentes sustituyentes en las posiciones mencionadas. En segundo lugar, se propone evitar las interacciones desfavorables observadas con la proteína en las simulaciones de *docking* de pirazoloquinolinonas, mediante la modificación o sustitución de estos grupos que generan interacciones desfavorables. Una vez calculada la contribución individual de cada sustituyente en diversas posiciones, se plantea una combinación de los mejores fragmentos conservando la estructura base de pirazoloquinolinona.

Por último, las estructuras optimizadas como inhibidores de Chk1 que surjan del estudio computacional, podrían ser sintetizadas mediante calentamiento convencional o por irradiación con microondas. En particular, se plantea la obtención de quinolin-2-onas, a partir de anilinas y 2-(etoxi(hidroxi)metileno)malonato, empleando una vía de síntesis similar a la utilizada para la formación de quinolin-4-onas.

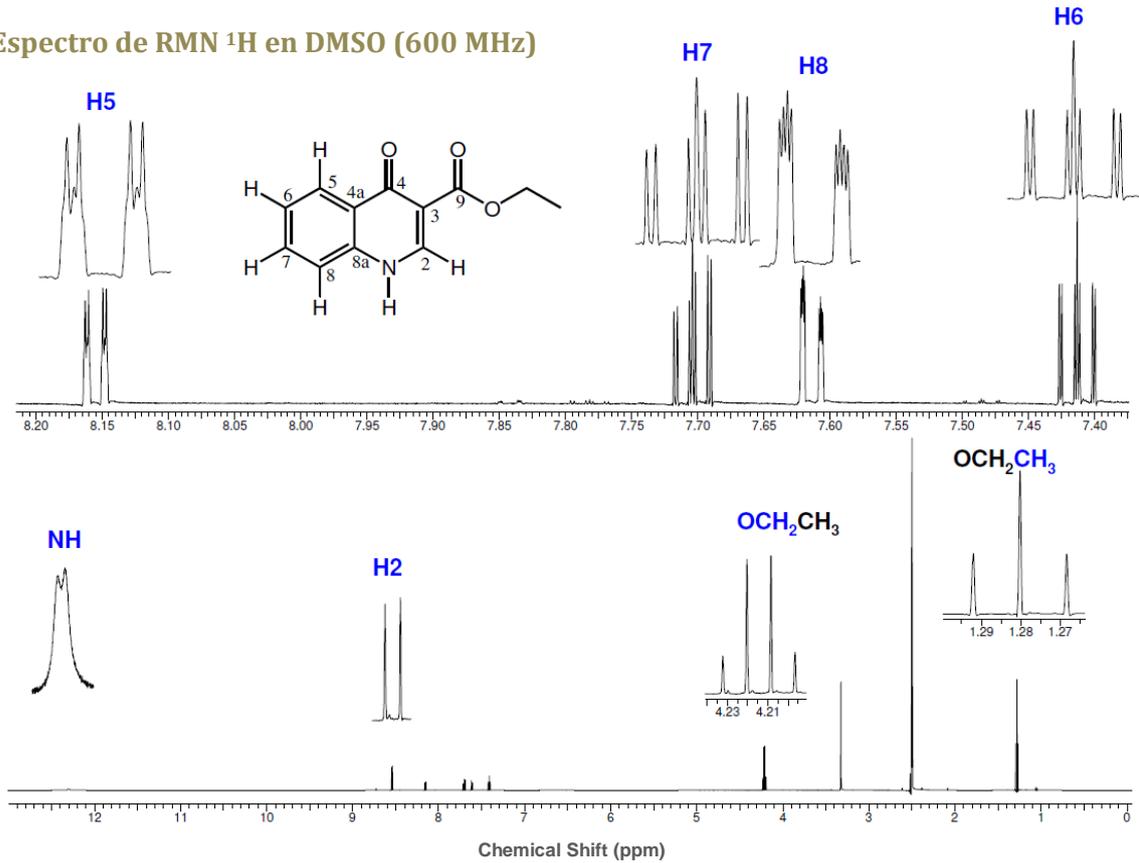
ANEXO

Caracterización de compuestos

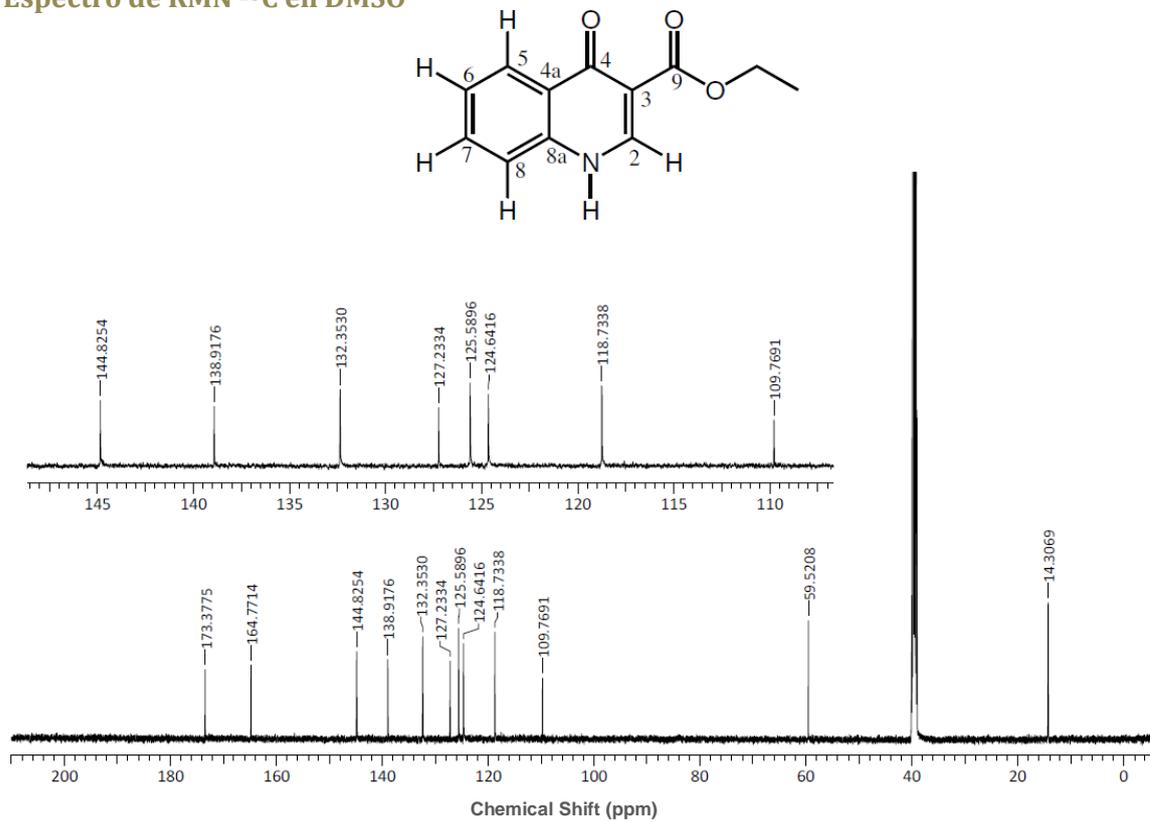
Caracterización por espectroscopía de RMN

Serie 3-carboetoxi-quinolin-4-onas (Q1-13)

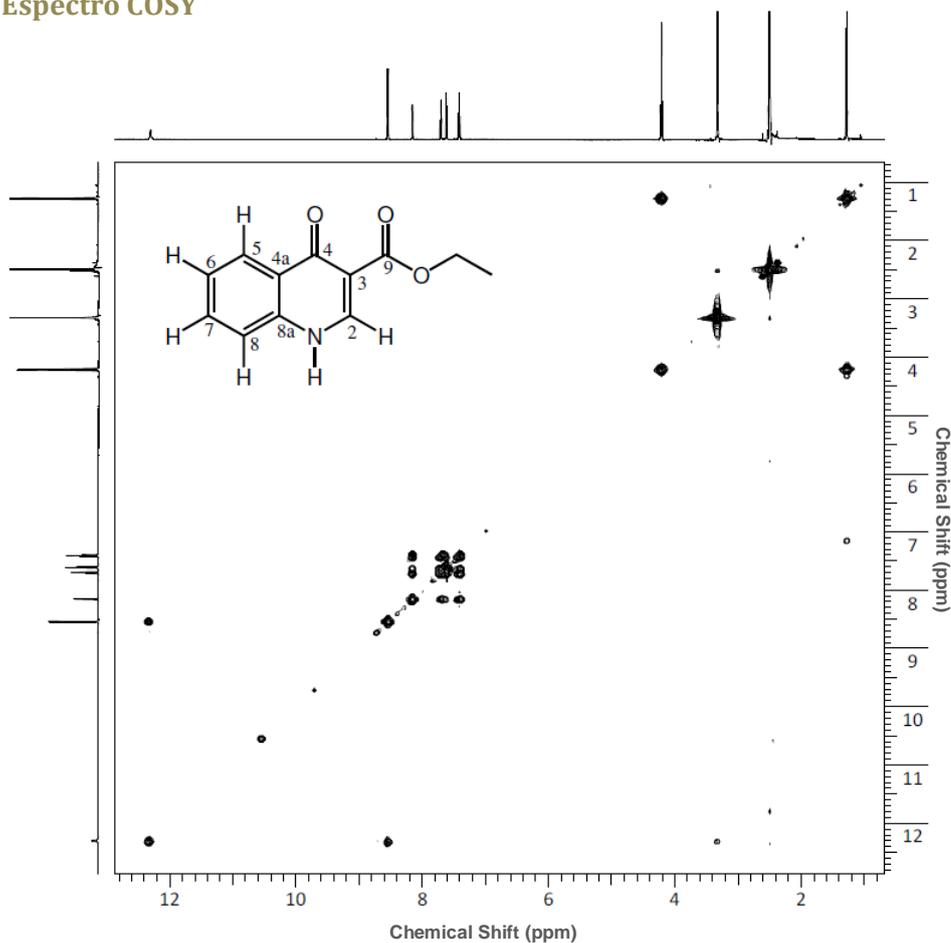
Espectro de RMN ^1H en DMSO (600 MHz)



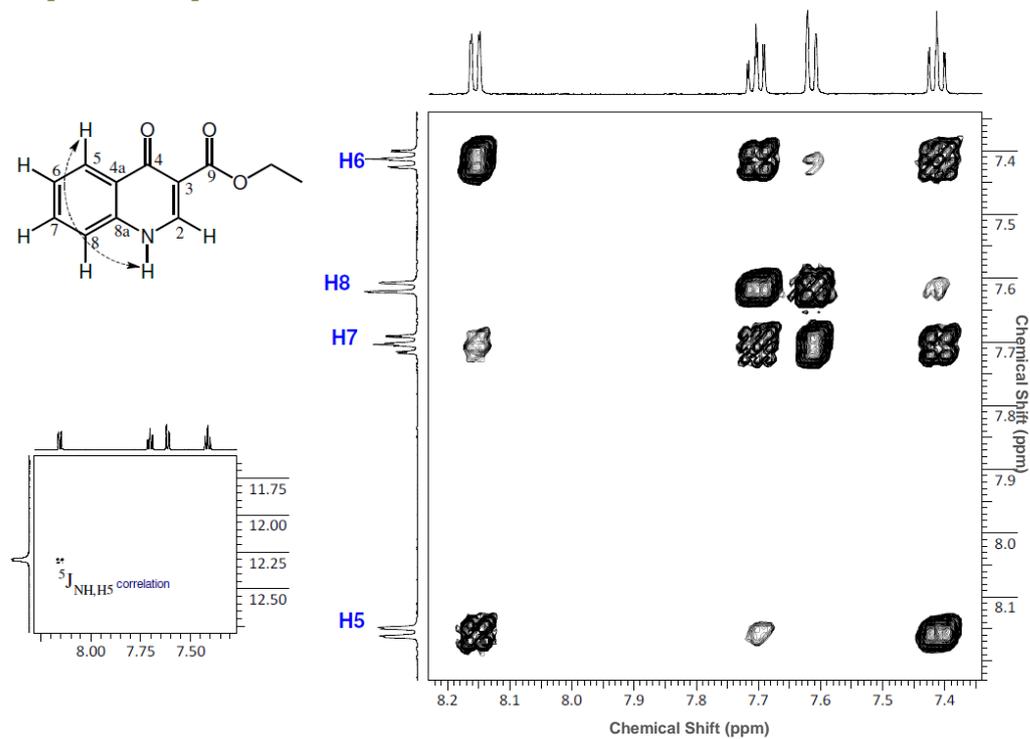
Espectro de RMN ^{13}C en DMSO



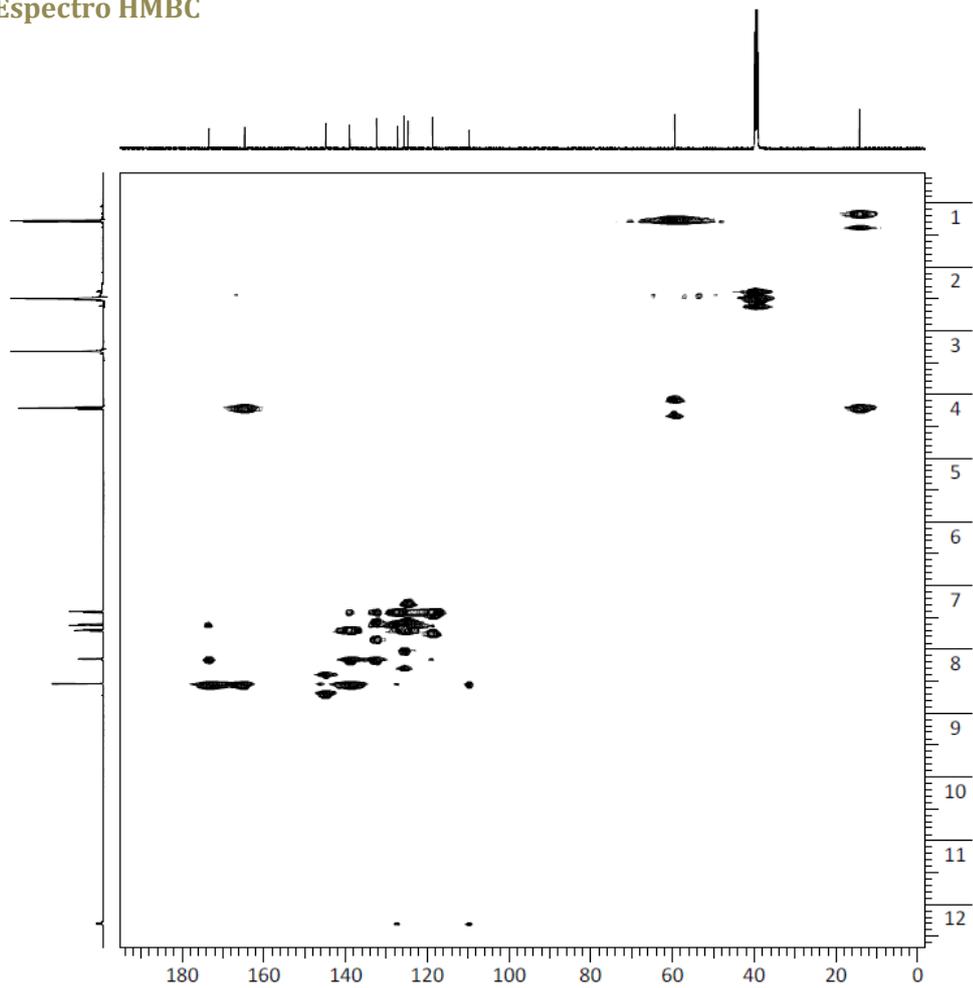
Espectro COSY



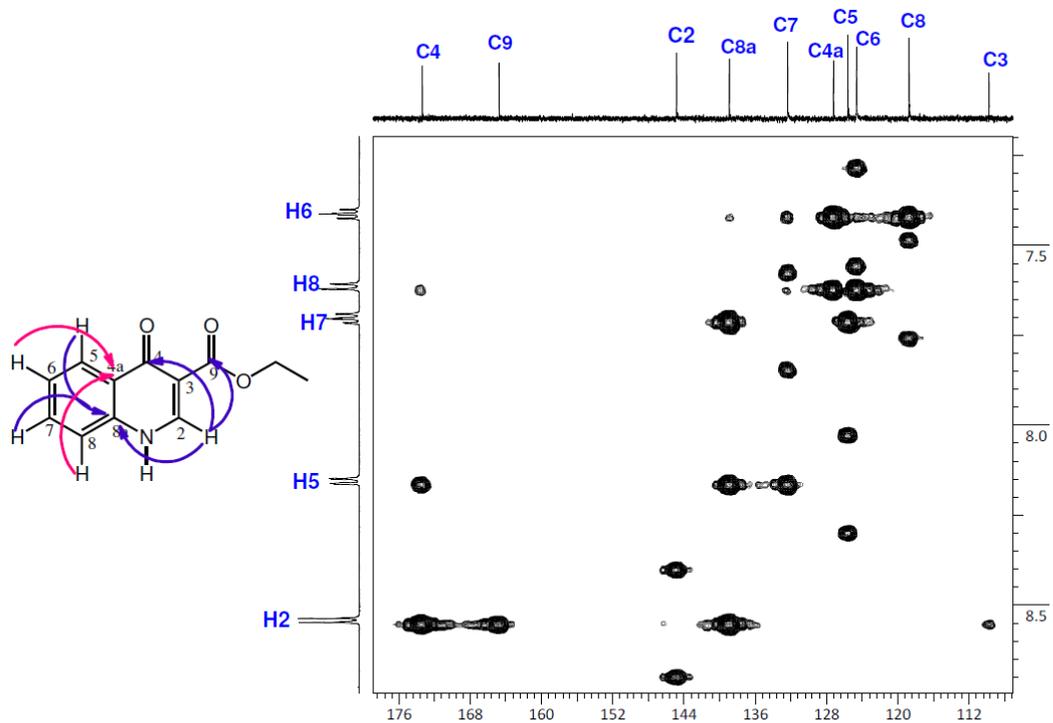
Ampliación espectro COSY



Espectro HMBC



Ampliación espectro HMBC



3-carboetoxi-quinolin-4-ona (Q1): Sólido blanco; descompone >250 °C; RMN ¹H (600 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,28 (t, 3H, J= 7,1 Hz); 4,21 (q, 2H, J= 7,1); 7,41 (ddd, 1H, J=8,1; 7,0 y 1,1 Hz); 7,61 (ddd, 1H, J= 8,3; 1,1 and 0,6 Hz); 7,70 (ddd, 1H, J= 8,3; 7,0 y 1,5 Hz); 8,15 (ddd, 1H, J= 8,1; 1,5 y 0,7 Hz); 8,54 (d, 1H, J= 6,7 Hz); 12,30 (dd, 1H, J= 6,7 y 0,7 Hz); RMN ¹³C (150,9 MHz, DMSO): δ (ppm) 14,31; 59,52; 109,77; 118,73; 124,64; 125,59; 127,23; 132,35; 138,92; 144,83; 164,77; 173,38.

3-carboetoxi-6-metil-quinolin-4-ona (Q2): Sólido blanco; descompone >280 °C; RMN ¹H (600 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,28 (t, 3H, J= 7,1 Hz); 2,42 (s, 3H); 4,21 (q, 2H, J= 7,1 Hz); 7,51 (dd, 1H, J= 8,2 y 0,7 Hz); 7,53 (dd, 1H, J= 8,2 y 1,8 Hz); 7,95 (s, 1H); 8,49 (d, 1H, J= 6,7 Hz); 12,24 (d, 1H, J= 6,7 Hz); RMN ¹³C (150,9 MHz, DMSO) δ (ppm): 14,32; 20,77; 50,44; 109,46; 118,64; 124,91; 127,17; 133,58; 134,12; 136,91; 144,33; 164,81; 173,23.

3-carboetoxi-6-metoxi-quinolin-4-ona (Q3): Sólido marrón claro; descompone >280 °C; RMN ¹H (600 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,28 (t, 3H, J= 7,1 Hz); 3,89 (s, 3H); 4,21 (q, 2H, J= 7,1 Hz); 7,34 (dd, 1H, J= 8,9 y 3,0 Hz); 7,57 (d, 1H, J= 3,0 Hz); 7,58 (d, 1H, J= 8,9 Hz); 8,49 (d, 1H, J= 6,7 Hz); 12,30 (dd, 1H, J= 6,7 Hz); RMN ¹³C (150,9 MHz, DMSO): δ (ppm) 14,31; 55,42; 59,44; 105,50; 106,63; 120,48; 122,14; 128,48; 133,29; 143,58; 156,55; 164,91; 172,81.

3-carboetoxi-7-metoxi-quinolin-4-ona (Q4): Sólido marrón claro; descompone >280 °C; RMN ¹H (600 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,27 (t, 3H, J= 7,1 Hz); 3,86 (s, 3H); 4,19 (q, 2H, J= 7,1 Hz); 6,99-7,02 (m, 2H); 8,05 (d, 1H, J= 9,7 Hz); 8,48 (s, 1H).

3-carboetoxi-6-cloro-quinolin-4-ona (Q5): Sólido blanco; descompone >280 °C; RMN ¹H (600 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,28 (t, 3H, J= 7,1 Hz); 4,21 (q, 2H, J= 7,1 Hz); 7,67 (d, 1H, J= 8,8 Hz); 7,76 (dd, 1H, J= 8,8 y 2,4 Hz); 8,08 (d, 1H, J= 2,4 Hz); 8,58 (d, 1H, J= 6,6 Hz); 12,5 (d, 1H, J= 6,6 Hz); RMN ¹³C (150,9 MHz, DMSO): δ (ppm) 17,29; 59,68; 110,03; 121,24; 124,58; 128,34; 129,34; 132,45; 137,66; 145,19; 164,53; 172,16.

3-carboetoxi-5,7-dicloro-quinolin-4-ona (Q6): Sólido blanco; descompone >280 °C; RMN ¹H (400 MHz, TFA): δ (ppm) 1,45 (t, 3H, J= 7,2 Hz); 4,61 (q, 2H, J= 7,2 Hz); 7,86 (d, 1H, J= 1,7 Hz); 7,98 (d, 1H, J= 1,7 Hz); 9,22 (s, 1H); RMN ¹³C (100 MHz, TFA): δ (ppm) 14,45; 67,47; 107,81; 118,11; 120,86; 135,87; 138,74; 144,09; 147,13; 148,54; 170,26; 177,38.

6-bromo-3-carboetoxi-quinolin-4-ona (Q7): Sólido blanco; descompone >300 °C; RMN ¹H (600 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,28 (t, 3H, J= 7,1 Hz); 4,22 (q, 2H, J= 7,1 Hz); 7,60 (d, 1H, J= 8,8 Hz); 7,86 (dd, 1H, J= 8,8 y 2,3 Hz); 8,22 (d, 1H, J= 2,3 Hz); 8,59 (s, 1H); 12,5 (s, 1H); RMN ¹³C (150,9 MHz, DMSO): δ (ppm) 14,43; 67,22; 107,83; 123,49; 123,67; 127,42; 129,46; 140,44; 143,61; 147,53; 169,71; 174,89.

3-carboetoxi-6-iodo-quinolin-4-ona (Q8): Sólido blanco; descompone >280 °C; RMN ¹H (600 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,28 (t, 3H, J= 7,1 Hz); 4,21 (q, 2H, J= 7,1 Hz); 7,44 (d, 1H, J= 8,7 Hz); 7,99 (dd, 1H, J= 8,7 y 2,2 Hz); 8,42 (d, 1H, J= 2,2 Hz); 8,57 (d, 1H, J= 6,7 Hz); 12,40 (d, 1H, J= 6,7 Hz); RMN ¹³C (150,9 MHz, DMSO): δ (ppm) 14,29; 59,67; 89,62; 110,28; 121,17; 128,90; 134,06; 138,30; 140,47; 145,16; 164,51; 171,94.

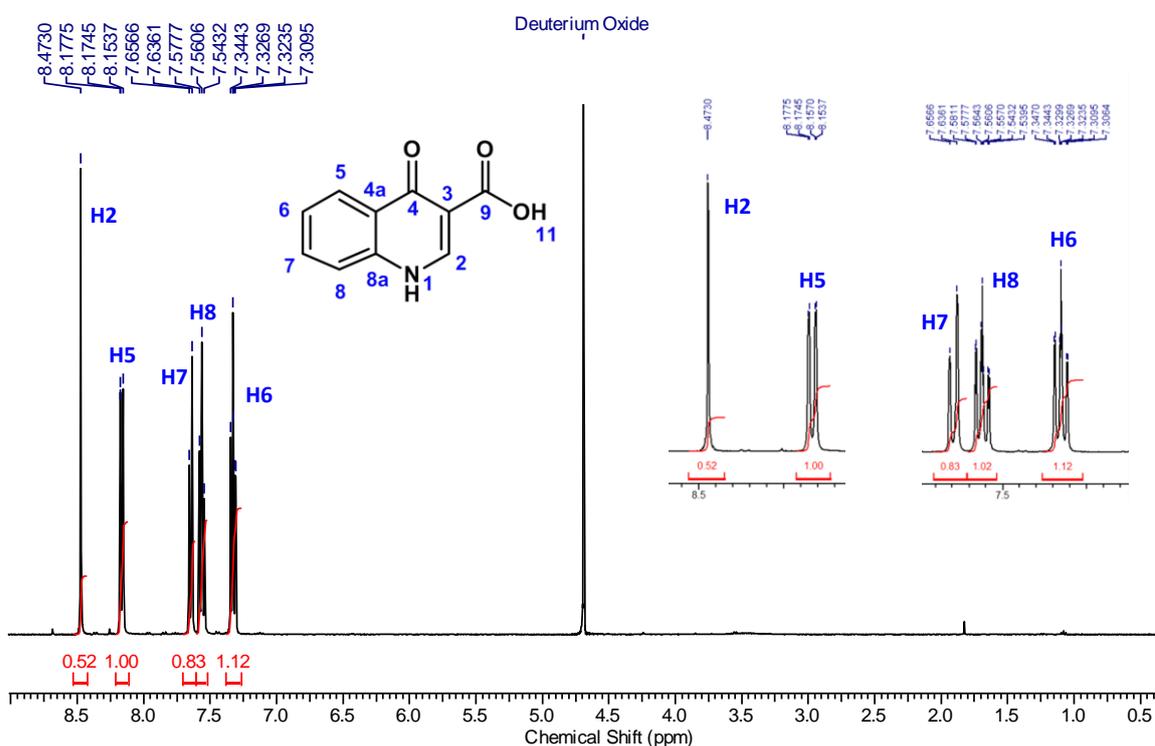
3-carboetoxi-6-fluor-7-(trifluorometil)-quinolin-4-ona (Q9): Sólido blanco; descompone >280 °C; RMN ¹H (400 MHz, TFA): δ (ppm) 0,74 (t, 3H, J= 7,1 Hz); 3,90 (q, 2H, J= 7,1 Hz); 7,61 (d, 1H, J= 9,2 Hz); 7,77 (d, 1H, J= 5,3 Hz); 8,65 (s, 1H); RMN ¹³C (100 MHz, TFA): δ (ppm) 14,22; 67,36; 108,36; 113,57; 113,82; 123,47; 125,83; 137,51; 148,64; 159,76; 162,40; 169,28; 175,08.

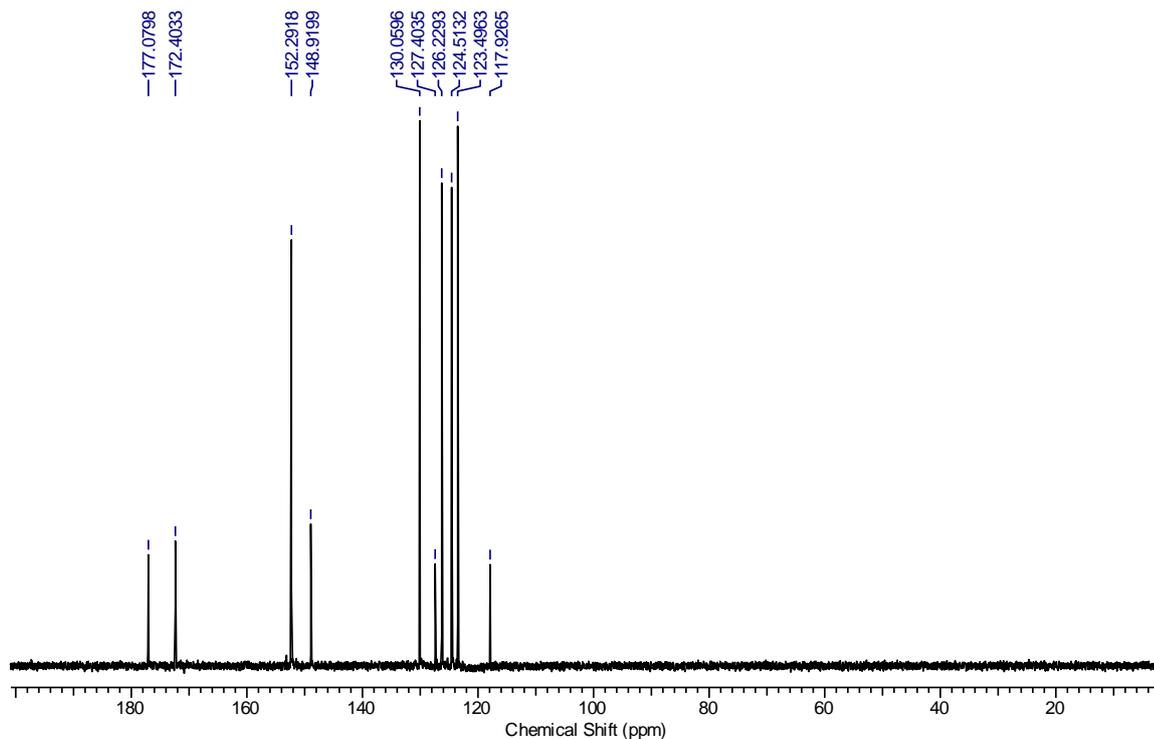
3-carboetoxi-6-carboxi-quinolin-4-ona (Q11): Sólido beige; descompone $>280\text{ }^{\circ}\text{C}$; RMN ^1H (400 MHz, TFA): δ (ppm) 0,81 (t, 3H, $J=7,2$ Hz); 3,98 (q, 2H, $J=7,16$ Hz); 7,56 (d, 1H, $J=8,9$ Hz); 8,13 (d, 1H, $J=8,8$ Hz); 8,71 (s, 1H); 8,75 (s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, TFA): δ (ppm) 9,61; 62,58; 103,45; 117,39; 118,54; 125,86; 127,84; 134,85; 139,41; 144,71; 164,78; 166,72; 172,01.

3-carboetoxi-6-nitro-quinolin-4-ona (Q12): Sólido amarillo; descompone $>280\text{ }^{\circ}\text{C}$; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,28 (t, 3H, $J=7,1$ Hz); 4,24 (q, 2H, $J=7,1$ Hz); 7,82 (d, 1H, $J=9,0$ Hz); 8,47 (dd, 1H, $J=2,7$ y $9,2$ Hz); 8,65 (s, 1H); 8,87 (d, 1H, $J=2,7$ Hz); 12,75 (s, 1H).

Serie 3-carboxi-quinolin-4-onas (Q14-22)

Espectro de RMN ^1H en D_2O (400 MHz)



Espectro de RMN ^{13}C en D_2O (400 MHz)

3-carboxi-quinolin-4-ona (Q14): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ (ppm) 7,33 (ddd, 1H, $J=7,9$; 7,5 y 1,1 Hz); 7,56 (ddd, 1H, $J=7,7$; 7,5 y 1,4 Hz); 7,65 (d, 1H, $J=8,2$); 8,16 (dd, 1H, $J=8,2$ y 1,2 Hz); 8,47 (s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ (ppm) 117,93; 123,50; 124,51; 126,23; 127,40; 130,06; 148,92; 152,29; 172,40; 177,08.

3-carboxi-6-metil-quinolin-4-ona (Q15): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 2,49 (s, 3H); 7,73 (s, 1H); 7,74 (s, 1H); 8,10 (s, 1H); 8,86 (s, 1H); 13,39 (s, 1H); 15,49 (s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO): 21,27; 117,87; 119,95; 124,57; 124,79; 135,77; 136,48; 138,02; 144,87; 166,96; 178,53.

3-carboxi-6-metoxi-quinolin-4-ona (Q16): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,90 (s, 3H); 7,51 (dd, 1H, $J=2,9$ y 9,1 Hz); 7,63 (d, 1H, $J=2,9$ Hz); 7,77 (d, 1H, $J=9,0$ Hz); 8,81 (s, 1H); 13,40 (s, 1H); 15,53 (s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO): 56,17; 104,64; 107,37; 121,89; 124,86; 126,14; 134,58; 143,86; 157,92; 167,05; 177,95.

3-carboxi-7-metoxi-quinolin-4-ona (Q17): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,90 (s, 3H); 7,18 (dd, 2H, $J=2,4$ y 9,7 Hz); 8,16 (d, 1H, $J=9,7$); 8,80 (s, 1H); 13,13 (s, 1H); 15,50 (s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO): 56,30; 100,92; 107,76; 116,75; 118,84; 127,33; 142,01; 145,41; 163,84; 166,93; 178,09.

3-carboxi-6-cloro-quinolin-4-ona (Q18): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,87 (d, 1H, $J=8,9$ Hz); 7,91 (dd, 1H, $J=2,4$ y 8,8 Hz); 8,18 (d, 1H, $J=2,2$ Hz); 8,91 (s, 1H); 13,55 (s, 1H); 14,97 (s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO): δ (ppm) 108,46; 122,53; 124,42; 126,05; 131,30; 134,44; 138,61; 146,04; 166,42; 177,69.

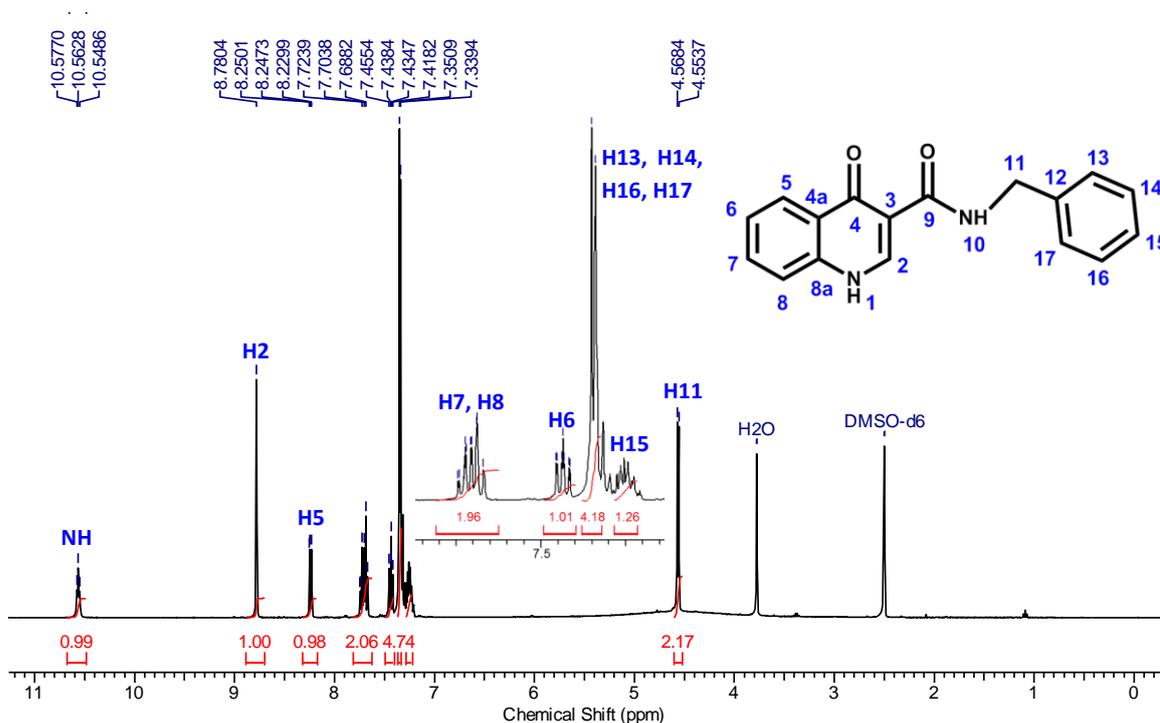
3-carboxi-5,7-dicloro-quinolin-4-ona (Q19): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,73 (d, 1H, $J=2,0$ Hz); 7,79 (d, 1H, $J=2,0$ Hz); 8,91 (s, 1H); 15,10 (s, 1H).

6-bromo-3-carboxi-quinolin-4-ona (Q20): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,78 (d, 1H, $J=9,0$ Hz); 8,04 (dd, 1H, $J=2,3$ y 8,8 Hz); 8,36 (d, 1H, $J=2,2$ Hz); 8,95 (s, 1H); 13,55 (s, H); 15,00 (s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO): δ (ppm) 108,55; 119,41; 122,58; 126,37; 127,58; 137,05; 138,87; 146,08; 166,39; 177,58.

3-carboxi-6-iodo-quinolin-4-ona (Q21): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,64 (d, 1H, $J=8,8$ Hz); 8,17 (dd, 1H, $J=2,0$ y 8,8 Hz); 8,56 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 8,92 (s, 1H); 13,57 (s, 1H); 15,03 (s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO): δ (ppm) 91,98; 108,59; 122,26; 126,57; 133,83; 139,21; 142,39; 145,82; 166,44; 177,43.

Serie 3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-onas (Q23-26)

Espectro de RMN ^1H en DMSO (400 MHz)



3-(*N*-bencil)carboxamida-quinolin-4-ona (Q23): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 4,56 (d, 2H, $J=5,9$ Hz); 7,23-7,28 (m, 1H); 7,34 (s, 2H); 7,35 (s, 2H) 7,43 (td, 1H, $J=1,5$ y 7,4 Hz); 7,67-7,74 (m, 2H); 8,24 (dd, 1H, $J=1,1$ y 8,1 Hz); 8,78 (s, 1H); 10,56 (t, 1H, $J=5,7$ Hz).

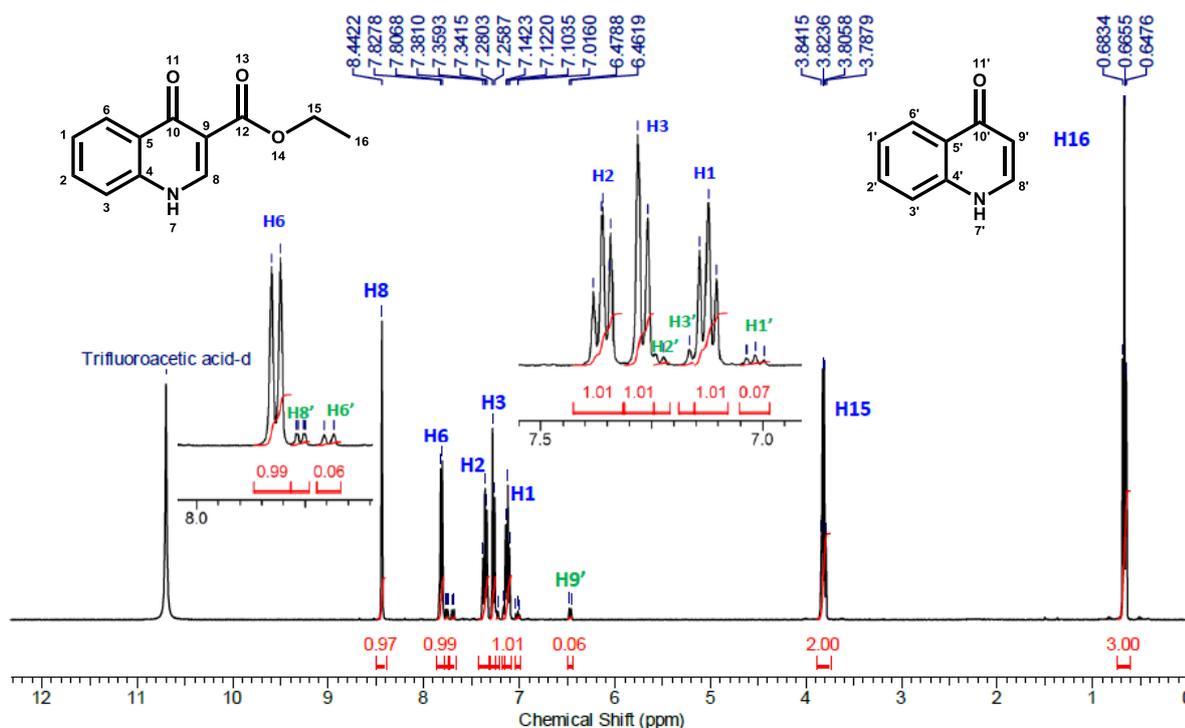
3-(*N*-bencil)carboxamida-6-metil-quinolin-4-ona (Q24): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 2,44 (s, 3H); 4,56 (d, 2H, $J=5,9$ Hz); 7,23-7,29 (m, 1H); 7,34 (s, 2H); 7,35 (s, 2H); 7,56-7,61 (m, 2H); 8,03 (s, 1H); 8,73 (s, 1H); 10,51 (t, 1H, $J=5,8$ Hz).

3-(*N*-bencil)carboxamida-6-metoxi-quinolin-4-ona (Q25): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,86 (s, 3H); 4,57 (d, 2H, $J=5,9$ Hz); 7,24-7,29 (m, 1H); 7,35 (d, 4H, $J=4,4$ Hz); 7,40 (dd, 1H, $J=2,9$ y 9,0 Hz); 7,63 (d, 1H, $J=2,9$ Hz); 7,66 (d, 1H, $J=9,2$ Hz); 8,71 (s, 1H); 10,53 (t, 1H, $J=5,8$ Hz).

3-(*N*-bencil)carboxamida-6-fluor-7-(trifluorometil)-quinolin-4-ona (Q26): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 4,57 (d, 2H, $J=5,9$ Hz); 7,24-7,29 (m, 1H); 7,34 (s, 2H); 7,35 (s, 2H); 8,12-8,18 (m, 2H); 8,94 (s, 1H); 10,20 (t, 1H, $J=5,9$ Hz).

Serie quinolin-4-onas (Q'1, 3, 5, 8, 12)

Espectro de RMN ^1H en TFA (400 MHz)



quinolin-4-ona (Q'1): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, TFA): δ (ppm) 6,47 (dd, 1H, $J=1,63$ y 6,66 Hz); 7,02 (t, 1H, $J=7,64$ Hz); 7,14-7,17 (m, 1H); 7,21-7,24 (m, 1H); 7,69 (d, 1H, $J=8,45$ Hz); 7,76 (dd, 1H, $J=1,60$ y 6,80 Hz).

6-metoxi-quinolin-4-ona (Q'3): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, TFA): δ (ppm) 6,46 (d, 1H, $J=6,40$ Hz); 6,92 (dd, 1H, $J=2,58$ y 8,70 Hz); 6,95-6,98 (m, 1H); 7,10-7,12 (m, 1H); 7,65 (d, 1H, $J=6,46$ Hz).

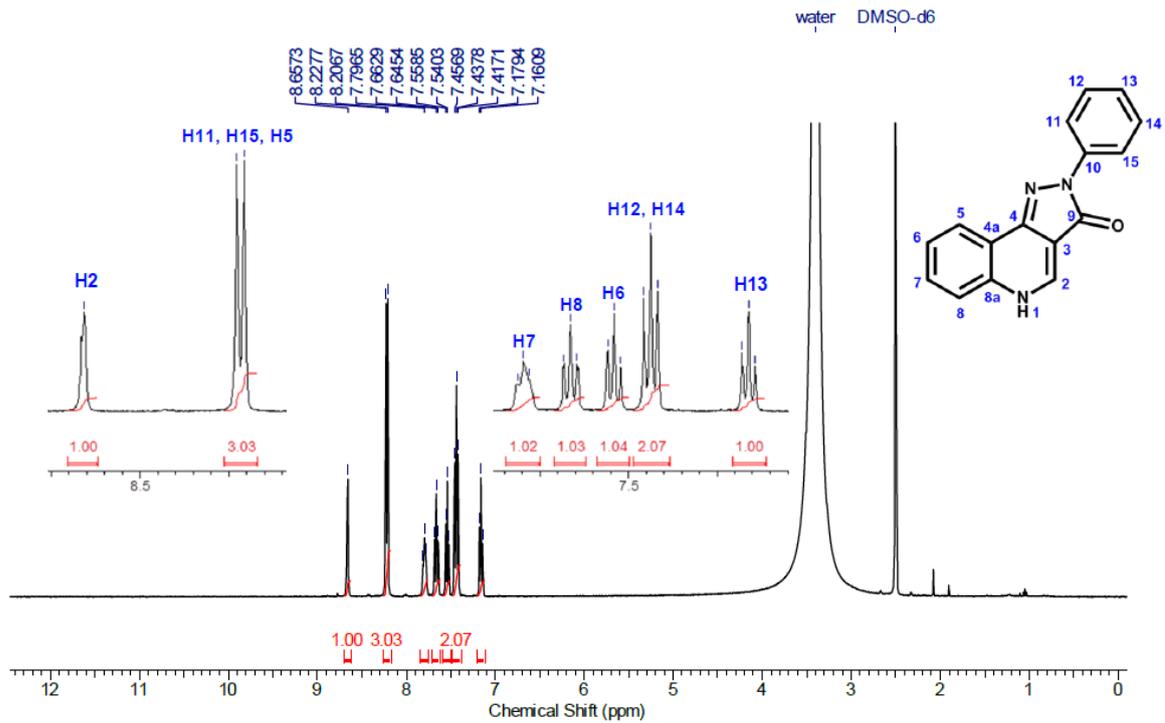
6-cloro-quinolin-4-ona (Q'5): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, TFA): δ (ppm) 6,06 (d, 1H, $J=7,28$ Hz); 7,57 (d, 1H, $J=8,80$ Hz); 7,67 (dd, 1H, $J=2,48$ y 9,04 Hz); 7,93 (t, 1H, $J=7,04$ Hz); 8,00 (d, 1H, $J=2,52$ Hz); 11,90 (s, 1H).

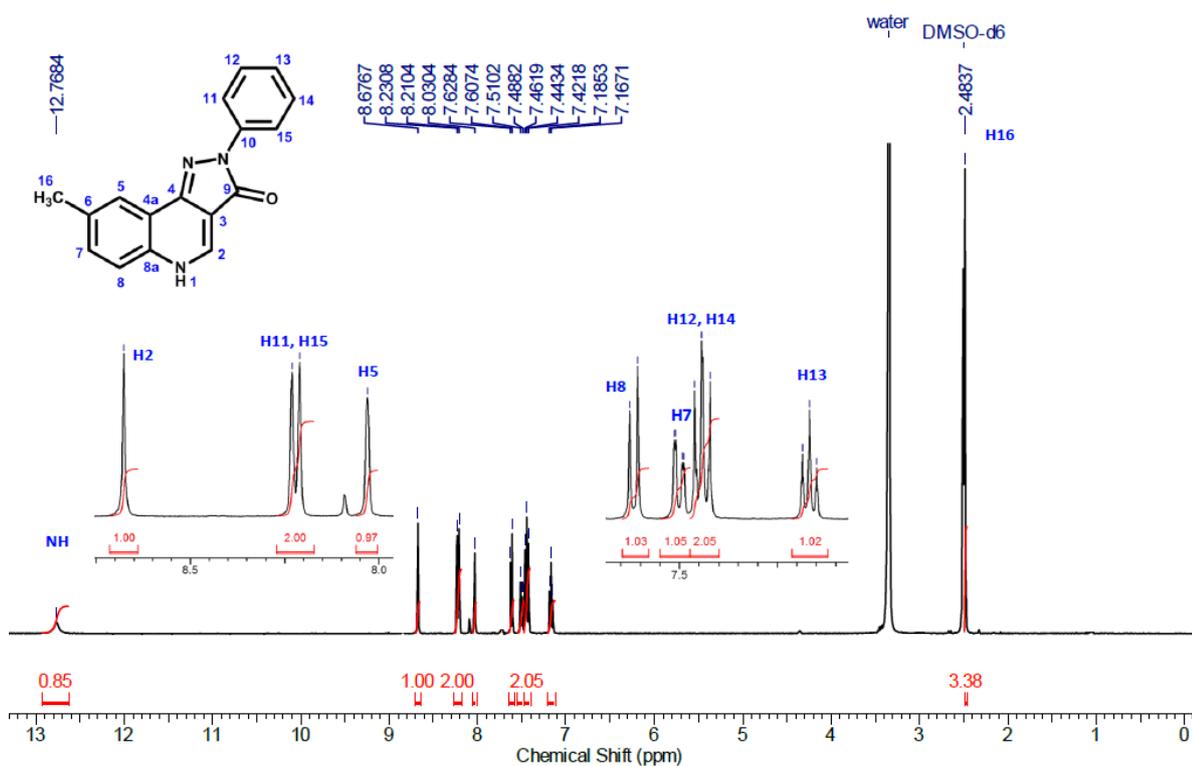
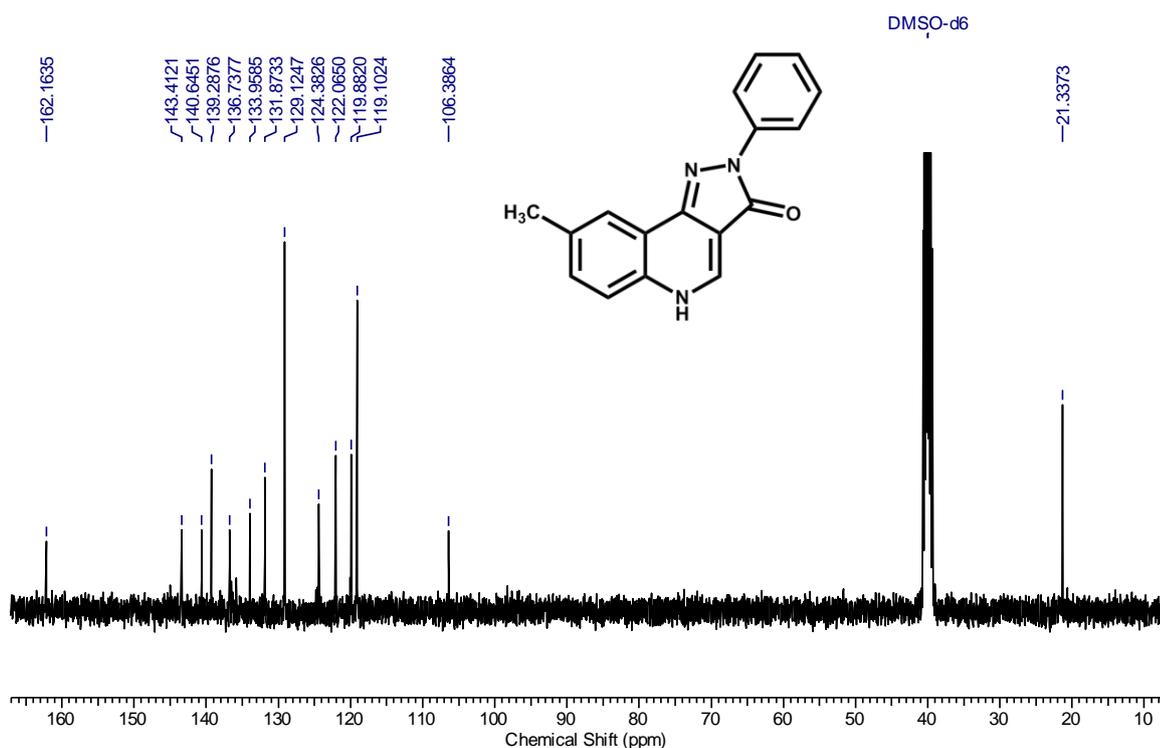
6-iodo-quinolin-4-ona (Q'8): Sólido blanco; RMN ^1H (400 MHz, TFA): δ (ppm) 6,50 (dd, 1H, $J=3,33$ y 6,40 Hz); 6,90 (dd, 1H, $J=3,40$ y 9,10 Hz); 7,51 (d, 1H, $J=8,74$ Hz); 8,10 (s, 1H); 8,55 (d, 1H, $J=3,60$ Hz).

6-nitro-quinolin-4-ona (Q'12): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 6,17 (d, 1H, $J=7,61$ Hz); 7,72 (d, 1H, $J=9,15$ Hz); 8,03 (dd, 1H, $J=5,65$ y 7,72 Hz); 8,41 (dd, 1H, $J=2,68$ y 9,08 Hz); 8,83 (d, 1H, $J=2,56$); 12,25 (s, 1H).

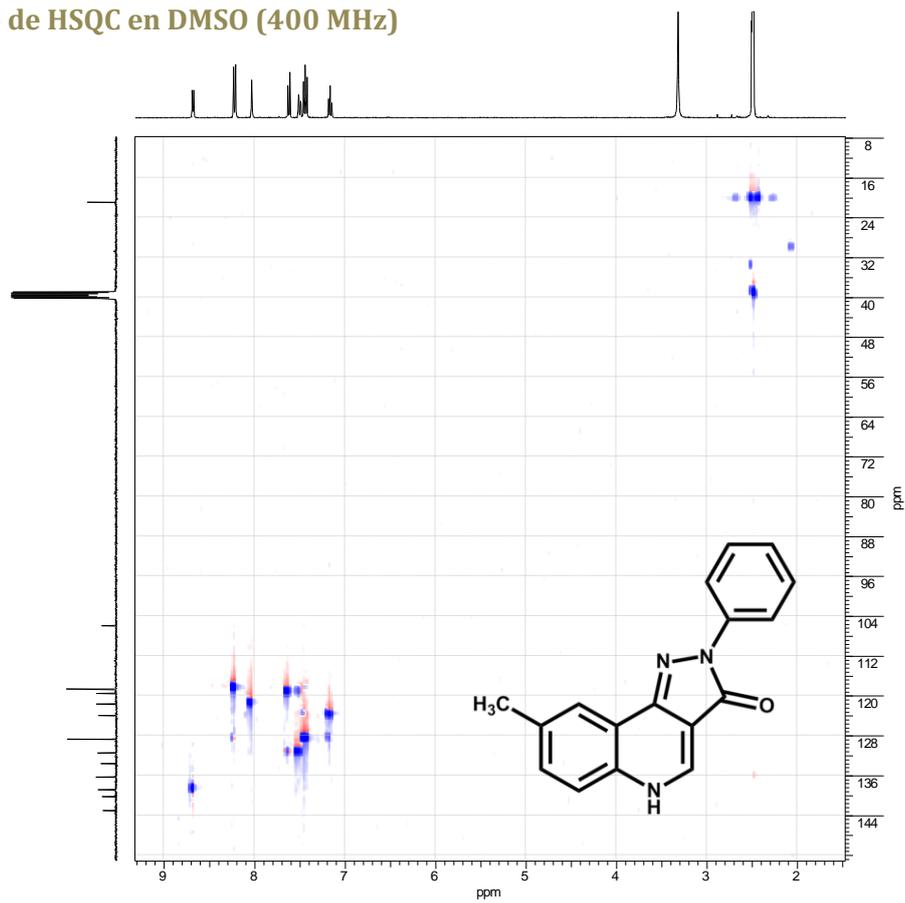
Serie pirazolo[4,3-c]quinolin-3-onas (PQ1-30)

Espectro de RMN ^1H en DMSO (400 MHz)

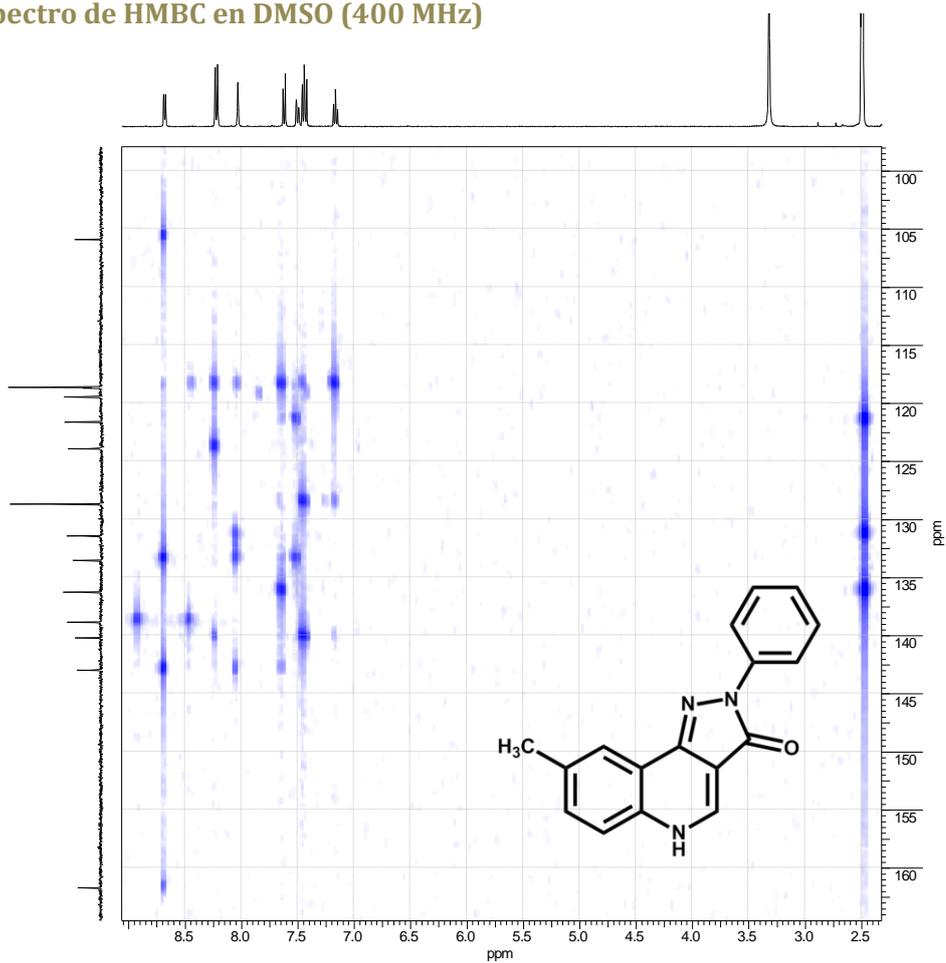


Espectro de RMN ^1H en DMSO (400 MHz)Espectro de RMN ^{13}C en DMSO (400 MHz)

Espectro de HSQC en DMSO (400 MHz)



Espectro de HMBC en DMSO (400 MHz)



2-fenil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ1): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,16 (t, 1H, $J=7,3$ Hz); 7,44 (t, 2H, $J=8,0$ Hz); 7,54 (t, 1H, $J=7,2$ Hz); 7,66 (t, 1H, $J=7,7$ Hz); 7,80 (t, 1H, $J=6,4$ Hz); 8,22 (d, 3H, $J=8,4$ Hz); 8,66 (s, 1H).

2-(2-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ2): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) ; RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,28-7,47 (m, 3H); 7,50-7,60 (m, 2H); 7,63-7,74 (m, 2H); 8,13 (d, 1H, $J=7,9$ Hz); 8,72 (s, 1H); 12,80 (s, 1H).

2-(4-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ3): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) ; RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,29 (t, 2H, $J=9,0$ Hz); 7,56 (t, 1H, $J=8,1$ Hz); 7,66-7,73 (m, 2H); 8,20-8,25 (m, 3H); 8,74 (s, 1H); 12,88 (s, 1H).

2-(4-metoxifenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ4): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) ; RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,78 (s, 3H); 7,02 (d, 2H, $J=9,2$ Hz); 7,55 (t, 1H, $J=8,0$ Hz); 7,63-7,73 (m, 2H); 8,08 (d, 2H, $J=9,2$ Hz); 8,21 (d, 1H, $J=7,9$ Hz); 8,70 (d, 1H, $J=5,1$ Hz); 12,80 (s, 1H).

2-fenil-8-metil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ5): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 2,48 (s, 3H); 7,17 (t, 1H, $J=7,3$ Hz); 7,44 (t, 2H, $J=7,6$ Hz); 7,50 (dd, 1H, $J=1,8$ y 8,7 Hz); 7,62 (d, 1H, $J=8,4$ Hz); 8,03 (s, 1H); 8,22 (d, 2H, $J=8,2$ Hz); 8,68 (s, 1H); 12,77 (s, 1H); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 21,34; 106,38; 119,10; 119,88; 122,07; 124,39; 129,13; 131,87; 133,96; 136,73; 139,29; 140,64; 143,41; 162,16.

2-(2-fluorofenil)-8-metil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ6): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 2,45 (s, 3H); 7,29-7,45 (m, 3H); 7,49 (dd, 1H, $J=1,5$ y 8,3 Hz); 7,55-7,62 (m, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,68 (d, 1H, $J=6,3$ Hz); 12,74 (d, 1H, $J=5,3$ Hz); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 20,85; 104,27; 116,32; 116,52; 118,77; 119,34; 121,50; 124,50; 128,46; 128,78; 128,85; 131,27; 133,31; 136,18; 139,01; 143,46; 154,97; 157,47; 161,59.

2-(4-fluorofenil)-8-metil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ7): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 2,48 (s, 3H); 7,28 (t, 2H, $J=8,8$ Hz); 7,50 (dd, 1H, $J=1,8$ y 8,3 Hz); 7,62 (d, 1H, $J=8,6$ Hz); 8,02 (s, 1H); 8,22-8,25 (m, 2H); 8,71 (d, 1H, $J=6,5$ Hz); 12,82 (d, 1H, $J=6,8$ Hz); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 20,86; 105,72; 115,18; 115,40; 118,60; 119,44; 120,37; 121,57; 131,44; 133,47; 136,30; 136,64; 138,97; 142,96; 157,37; 159,77; 161,48.

2-(4-metoxifenil)-8-metil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ8): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 2,48 (s, 3H); 3,78 (s, 3H); 7,01 (d, 2H, $J=9,3$ Hz); 7,49 (dd, 1H, $J=1,8$ y 8,5 Hz); 7,61 (d, 1H, $J=8,3$ Hz); 8,01 (s, 1H); 8,09 (d, 2H, $J=8,3$ Hz); 8,65 (s, 1H); 12,72 (s, 1H); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 20,87; 55,23; 105,96; 113,80; 118,68; 119,38; 120,28; 121,52; 131,22; 133,38; 133,65; 136,15; 138,61; 142,47; 155,83; 161,10.

2-fenil-8-metoxi-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ9): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,92 (s, 3H); 7,17 (t, 1H, $J=7,4$ Hz); 7,30 (dd, 1H, $J=2,8$ y 9,1 Hz); 7,44 (t, 2H, $J=8,0$ Hz); 7,59 (d, 1H, $J=2,9$ Hz); 7,67 (d, 1H, $J=9,0$ Hz); 8,23 (d, 2H, $J=7,6$ Hz); 8,66 (s, 1H); 12,82 (s, 1H).

2-(2-fluorofenil)-8-metoxi-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ10): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,90 (s, 3H); 7,28 (dd, 1H, $J=3,0$ y 9,3 Hz); 7,32-7,45 (m, 3H); 7,49 (d, 1H, $J=3,0$ Hz); 7,58 (td, 1H, $J=1,5$ y 7,9 Hz); 7,67 (d, 1H, $J=3,0$ Hz); 8,67 (d, 1H, $J=6,5$ Hz); 12,80 (d, 1H, $J=6,3$ Hz); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 55,66; 102,46; 103,55; 116,32;

116,51; 119,62; 120,14; 121,25; 124,55; 126,83; 128,77; 129,06; 129,61; 138,18; 143,55; 155,14; 157,55; 157,64; 161,64.

2-(4-fluorofenil)-8-metoxi-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ11): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,92 (s, 3H); 7,26-7,31 (m, 3H); 7,58 (d, 1H, $J=2,7$ Hz); 7,68 (d, 1H, $J=9,0$ Hz); 8,23-8,26 (m, 2H); 8,69 (d, 1H, $J=6,6$ Hz); 12,87 (d, 1H, $J=6,3$ Hz); RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 55,69; 102,57; 105,02; 115,17; 115,39; 119,74; 119,97; 120,40; 120,49; 121,32; 129,77; 136,67; 138,05; 143,01; 157,41; 157,60; 159,80; 161,49.

2-(4-metoxifenil)-8-metoxi-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ12): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,78 (s, 3H); 3,92 (s, 3H); 7,01 (d, 2H, $J=9,2$ Hz); 7,29 (dd, 1H, $J=2,6$ y $9,0$ Hz); 7,57 (d, 1H, $J=2,7$ Hz); 7,68 (d, 1H, $J=8,9$ Hz); 8,10 (d, 2H, $J=9,0$ Hz); 8,63 (s, 1H).

8-cloro-2-fenil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ13): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,21 (t, 1H, $J=7,4$ Hz); 7,48 (t, 2H, $J=7,7$ Hz); 7,69 (d, 1H, $J=8,8$ Hz); 7,85 (dd, 1H, $J=2,3$ y $8,8$ Hz); 8,23 (d, 2H, $J=8,0$ Hz); 8,35 (d, 1H, $J=2,0$ Hz); 8,79 (s, 1H).

8-cloro-2-(2-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ14): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,39-7,56 (m, 3H); 7,66 (t, 1H, $J=7,8$ Hz); 7,81 (d, 2H, $J=1,7$ Hz); 8,16 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 8,85 (s, 1H); 12,48 (s, 1H).

8-cloro-2-(4-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ15): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,38 (t, 2H, $J=8,8$ Hz); 7,75 (d, 1H, $J=8,7$ Hz); 7,78-7,83 (m, 2H); 8,29-8,33 (m, 2H); 8,87 (s, 1H).

8-cloro-2-(4-metoxifenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ16): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,87 (s, 1H); 7,11 (d, 2H, $J=9,2$ Hz); 7,77-7,86 (m, 3H); 8,16 (d, 2H, $J=9,0$ Hz); 8,81 (s, 1H).

7,9-dicloro-2-fenil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ17): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,19 (t, 1H, $J=7,2$ Hz); 7,45 (t, 2H, $J=7,5$ Hz); 7,70 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 7,75 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 8,21 (d, 2H, $J=78,5$ Hz); 8,77 (s, 1H); 12,77 (s, 1H); RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 107,79; 116,03; 117,65; 118,61; 124,34; 127,34; 128,78; 131,44; 133,58; 138,11; 139,74; 139,81; 141,18; 160,94.

7,9-dicloro-2-(2-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ18): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,39-7,58 (m, 3H); 7,66 (td, 1H, $J=1,5$ y $7,8$ Hz); 7,76 (d, 1H, $J=1,8$); 7,81 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 8,85 (s, 1H).

7,9-dicloro-2-(4-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ19): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,30 (t, 2H, $J=9,0$ Hz); 7,68 (s, 1H); 7,75 (s, 1H); 8,22 (m, 2H); 8,78 (s, 1H); 12,88 (s, 1H); RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 107,59; 115,28; 115,50; 115,94; 117,64; 120,34; 127,32; 131,39; 133,55; 136,29; 138,05; 139,77; 141,14; 157,59; 159,99; 160,69.

7,9-dicloro-2-(4-metoxifenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ20): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,78 (s, 3H); 7,03 (d, 2H, $J=9,0$ Hz); 7,67 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 7,73 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 8,09 (d, 2H, $J=8,8$ Hz); 8,74 (s, 1H); 12,83 (s, 1H); RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 55,26; 107,80; 113,91; 116,07; 117,73; 120,31; 127,22; 131,30; 133,31; 138,15; 139,63; 140,72; 156,12; 160,38.

8-bromo-2-fenil-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ21): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,18 (t, 1H, $J=7,5$ Hz); 7,45 (t, 2H, $J=7,7$ Hz); 7,66 (d, 1H, $J=8,8$ Hz); 7,83 (dd, 1H, $J=2,3$ y 8,8 Hz); 8,21 (d, 2H, $J=8,0$ Hz); 8,31 (d, 1H, $J=2,0$ Hz); 8,76 (s, 1H); 12,89 (s, 1H); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 106,49; 118,6; 118,68; 120,35; 121,80; 124,18; 128,68; 132,91; 134,56; 139,66; 139,93; 141,80; 161,47.

8-bromo-2-(2-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ22): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,30-7,45 (m, 3H); 7,57 (td, 1H, $J=1,8$ y 7,8 Hz); 7,66 (d, 1H, $J=8,8$ Hz); 7,82 (dd, 1H, $J=2,3$ y 8,8 Hz); 8,20 (d, 1H, $J=2,3$ Hz); 8,77 (d, 1H, $J=5,8$ Hz); 12,89 (d, 1H, $J=4,3$ Hz).

8-bromo-2-(4-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ23): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,29 (t, 2H, $J=9,0$ Hz); 7,67 (d, 1H, $J=8,8$ Hz); 7,84 (dd, 1H, $J=2,3$ y 8,8 Hz); 8,21-8,25 (m, 2H); 8,31 (d, 1H, $J=2,2$ Hz); 8,79 (d, 1H, $J=6,3$ Hz); 12,94 (d, 1H, $J=5,0$ Hz); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 106,32; 115,25; 115,47; 118,88; 120,51; 121,85; 124,20; 132,99; 134,55; 136,41; 139,86; 141,85; 157,53; 159,96; 161,29.

8-bromo-2-(4-metoxifenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ24): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,78 (s, 3H); 7,01 (d, 2H, $J=9,0$ Hz); 7,65 (d, 1H, $J=8,8$ Hz); 7,81 (dd, 1H, $J=2,0$ y 8,8 Hz); 8,08 (d, 2H, $J=9,0$ Hz); 8,28 (d, 1H, $J=2,0$ Hz); 8,75 (s, 1H); 12,87 (s, 1H); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 55,26; 106,54; 113,85; 118,75; 120,43; 121,88; 124,13; 132,74; 133,42; 134,55; 139,59; 141,39; 156,02; 160,94.

2-fenil-8-iodo-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ25): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,12 (d, 3H, $J=7,3$ Hz); 7,46 (d, 1H, $J=8,9$ Hz); 7,82 (d, 1H, $J=8,7$ Hz); 7,93 (dd, 2H, $J=1,7$ y 8,6 Hz); 8,47 (d, 1H, $J=1,5$ Hz); 9,08 (s, 1H).

8-iodo-2-(4-metoxifenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ26): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,77 (s, 3H); 7,00 (d, 2H, $J=9,0$ Hz); 7,49 (d, 1H, $J=8,5$ Hz); 7,94 (dd, 1H, $J=1,9$ y 8,7 Hz); 8,07 (d, 2H, $J=9,3$ Hz); 8,47 (d, 1H, $J=2,0$ Hz); 8,72 (s, 1H); 12,83 (s, 1H); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 55,72; 91,85; 107,18; 114,31; 121,04; 122,08; 130,68; 133,89; 135,29; 138,72; 139,91; 141,56; 156,49; 161,43.

2-fenil-8-fluor-7-(trifluorometil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ27): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,13 (d, 2H, $J=7,2$ Hz); 7,23-7,26 (m, 1H); 7,30 (t, 2H, $J=7,6$ Hz); 8,28 (s, 1H); 8,45 (d, 1H, $J=7,1$ Hz); 9,19 (s, 1H).

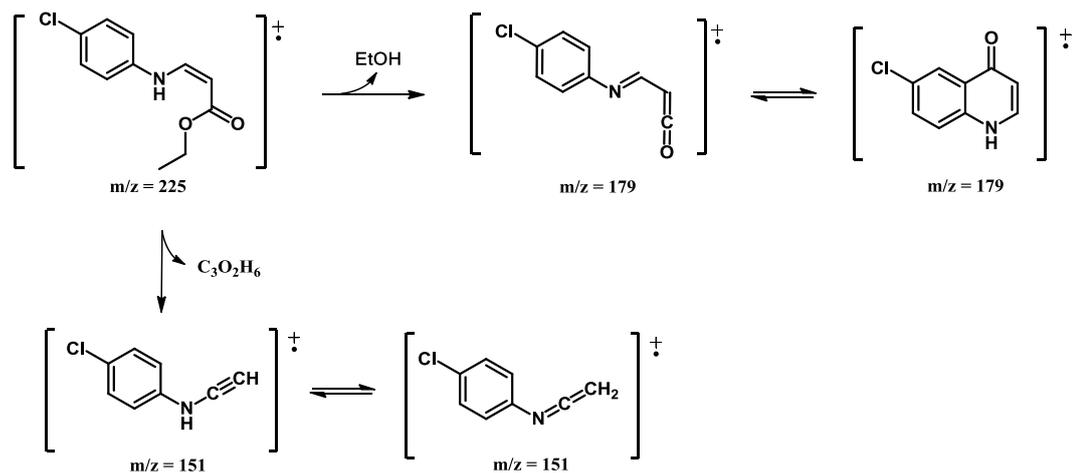
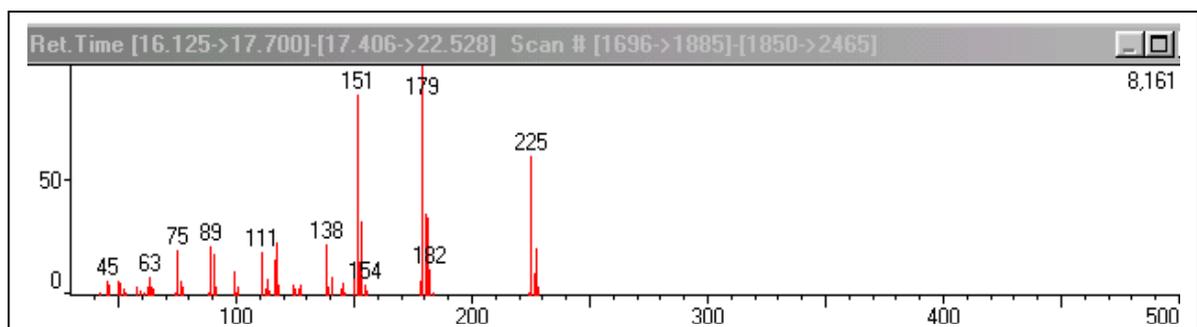
8-fluor-7-(trifluorometil)-2-(2-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ28): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,34 (td, 1H, $J=2,0$ y 7,7 Hz); 7,40 (td, 1H, $J=1,4$ y 9,3 Hz); 7,44-7,50 (m, 1H); 7,58 (td, 1H, $J=1,7$ y 7,7); 8,10 (m, 1H); 8,13 (s, 1H); 8,88 (s, 1H); 13,0 (s, 1H); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 104,98; 109,87; 110,09; 116,84; 117,03; 119,96; 124,26; 125,06; 129,10; 129,91; 132,21; 141,09; 142,62; 155,56; 158,05; 161,85.

8-fluor-7-(trifluorometil)-2-(4-fluorofenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ29): Sólido amarillo; RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 7,19 (t, 2H, $J=8,9$ Hz); 8,08 (d, 1H, $J=6,27$ Hz); 8,14 (s, 1H); 8,16-8,20 (m, 2H); 8,87 (s, 1H); 13,02 (s, 1H); RMN ¹³C (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 106,42; 109,84; 110,06; 115,70; 115,92; 119,97; 121,10; 123,89; 132,19; 136,64; 140,86; 141,99; 158,16; 160,56; 161,60.

8-fluor-7-(trifluorometil)-2-(4-metoxifenil)-pirazolo[4,3-c]quinolin-3-ona (PQ30): Sólido amarillo; RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,79 (s, 3H); 7,03 (d, 2H, $J=8,9$ Hz); 8,03-8,13 (m, 3H); 8,18 (d, 1H, $J=10,6$ Hz); 8,87 (s, 1H).

Caracterización por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

Espectro de masas



3-(fenilamino)acrilato (FA5). m/z (%): 225 (62, M^+); 179 (100); 151 (88).