



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química*



**Modelado, Diseño Racional
Y Desarrollo De Compuestos
De Interés Tecnológico
Y Farmacológico**

*Tesis Para Optar Al Grado De Doctor En
Ciencias, Área Química.*

Bioq. Lanza Castronuovo, Priscila Ailin.

~2019~

Director: Vera, Domingo Mariano Adolfo.

Co-director: Chesta, Carlos Alberto.

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	5
Agradecimientos.....	7
Índice de abreviaturas.....	8
Capítulo 1 . Introducción y Objetivos.....	10
1.1 La Química Computacional y el diseño de moléculas de interés farmacológico y tecnológico.....	10
1.2 Fotosensibilizadores para celdas solares.....	11
1.2.1 Teoría del Funcional de la densidad (DFT).....	13
1.2.2 Teoría del Funcional de la densidad dependiente del tiempo con respuesta lineal: LR-TDDFT.....	16
1.3 Diseño de fármacos.....	18
1.3.1 Estrategias en la búsqueda de nuevos fármacos.....	19
1.3.2 La problemática de la resistencia a múltiples drogas (MDR) en el tratamiento del cáncer..	20
1.3.3 Antecedentes de la glicoproteína-P humana como blanco terapéutico.....	23
1.3.4 Hacia la búsqueda de nuevos moduladores de P-gp.....	26
1.4 Parte 1: Diseño, síntesis y fotofísica de sistemas donador-aceptor unidos por base de Tröger...	27
1.4.1 Objetivos generales.....	27
1.4.2 Objetivos Particulares.....	28
1.5 Parte 2: Desarrollo de nuevos inhibidores de glicoproteína-P humana.....	28
1.5.1 Objetivos generales.....	28
1.5.2 Objetivos Particulares.....	29
Capítulo 2. Metodologías computacionales.....	42
2.1 Breve descripción de los programas de modelado computacional.....	42
2.1.1 Programas para aplicación de métodos de DFT y métodos más avanzados.....	42
2.1.2 Programas de construcción y visualización.....	42
2.1.3 Programas para el estudio de docking proteína-ligando.....	43
2.1.4 Programas para dinámica molecular.....	44
2.2 Parte 1: Diseño, síntesis y fotofísica de sistemas donador-aceptor unidos por base de Tröger...	44
2.2.1 Cálculos del grado de transferencia de carga.....	45
2.2.2 Aplicación del teorema de Koopmans.....	46
2.2.3 Gap Redox más allá de la aproximación de Koopmans.....	47
2.2.4 Análisis de las densidades electrónicas.....	47
2.2.5 Estudio de mecanismo de reacción de díadas con base de Tröger.....	48
2.3 Parte 2: Desarrollo de nuevos inhibidores de glicoproteína-P humana.....	49
2.3.1 Elección del modelo de P-gp humana.....	49
2.3.2 Ligandos seleccionados para el docking molecular.....	49
2.3.3 Screening de análogos a pinoresinol.....	50
2.3.4 Optimización de los ligandos.....	51
2.3.5 Docking Molecular.....	51
2.3.6 Comparación de estudios <i>in-sílico</i> e <i>in-vitro</i>	52
2.3.6.1 Ensayo de acumulación intracelular: reversión de la MDR vía IC ₅₀ de DOX.....	52
2.3.7 Dinámica del modelo de P-gp(h) en medio acuoso.....	53
2.3.8 Protocolo de docking flexible.....	54
2.3.9 Desarrollo de una dinámica de proteína inmersa en bicapa lipídica.....	54
PARTE I : Diseño, síntesis y fotofísica de sistemas Donor-Aceptor unidos por base de Tröger. 	61

Capítulo 3. Modelado de la fotofísica de díadas basadas en derivados de bases de Tröger.....	62
3.1 Validación de los protocolos de cálculo empleando sistemas D- σ -A alifáticos 'convencionales' y D- π -A conjugados conocidos.....	63
3.2 Prueba de principios para evaluar separación de carga en sistemas D- σ -A. Caracterización de los estados excitados.....	67
3.2.1 Separación de carga en sistemas D- σ -A y cálculo del gap redox Donor/Aceptor.....	81
3.2.2 Evaluación de la extensión de CT (Λ) en díadas A- σ -D y A- π -D.....	82
3.3 Conclusiones.....	83
Capítulo 4. Determinación del mecanismo de síntesis de díadas puenteadas por base de Tröger..	87
4.1 Reactividad en las reacciones modelo.....	89
4.2 Reacción (1 + 1 \rightarrow 5Z) y mecanismo general.....	90
4.3 Reacción de (1 + 2 \rightarrow 6Z) como modelo de síntesis asimétrica.....	98
4.4 Reacción (3 + 3 \rightarrow 7Z) y posibles subproductos.....	99
4.5 Evidencia de compuestos aislados e identificados.....	102
4.6 Conclusiones.....	104
PARTE 2: Desarrollo de nuevos inhibidores de glicoproteína-P humana.....	109
Capítulo 5. Búsqueda de inhibidores de P-gp a partir de extractos de plantas de Argentina.....	110
5.1 Análisis del modo de ligado (<i>binding mode</i>) del pinosresinol y derivados propuestos.....	111
5.1.1 Energías de binding e interacción molecular P-gp(h)-ligandos.....	113
5.2 Reversión del eflujo de DOX y citotoxicidad.....	114
5.3 Cinética de inhibición.....	117
5.4 Conclusiones.....	118
Capítulo 6. Diseño y ensayo de nuevos inhibidores de la P-gp.....	123
6.1 Screening de análogos del pinosresinol.....	123
6.2 Docking de los compuestos en la P-gp.....	126
6.3 Soporte experimental.....	138
6.3.1 Ensayo de inhibición del eflujo de DOX.....	138
6.3.2 Ensayo de inhibición del eflujo de rodamina 123.....	139
6.4 Dinámica molecular del modelo de P-gp(h) en solución y docking flexible.....	140
6.5 Preparación del modelo de la P-gp embebido en una membrana lipídica.....	142
6.6 Conclusiones.....	144
Información Suplementaria.....	I

Resumen

Se emplean metodologías del Modelado Molecular a fin de seleccionar, en algunos casos, y diseñar, en otros, moléculas con potenciales aplicaciones previamente esperadas. En la primera parte, aprovechando las propiedades inusuales de derivados de bases de Tröger, se explorará su potencial como diferentes dispositivos moleculares, entre ellas su potencial aplicación como moléculas antena para celdas solares sensibilizadas por colorantes orgánicos (organic DSSCs). Dichas peculiaridades residen fundamentalmente en su forma molecular, quiral aún sin carbonos asimétricos, su geometría en forma de "V", considerable rigidez y principalmente sus propiedades de transporte selectivo de carga. En especial este último aspecto permite esperar una fotoquímica también inusual, como se verá en el Capítulo 3. A este fin se propone un conjunto de posibles sistema donor/aceptor, puentado por bases de Tröger y se elegirán, aquellas que resulten más prometedoras y también más accesibles sintéticamente para su estudio interdisciplinario en colaboración con un grupo especializado en síntesis y el grupo del Codirector, que realizará los ensayos fotofísicos y fotoquímicos. En esta instancia, se busca un sistema "prueba de principios" de sistema Donor-puente Tröger – Aceptor con un paradigma diferente al utilizado hasta ahora en DSSCs orgánicas, es decir el esquema Donor- puente conjugado π – Aceptor. En este diseño el puente no sólo comunica electrónicamente los centros redox sino que podría ejercer un control sobre la separación de cargas inicial, su recombinación, su fotofísica e incluso participar como núcleo foto/electroactivo. Estudios preliminares en el grupo de investigación, permitieron demostrar que en ocasiones, este puente alifático puede actuar como un eficiente conector o "cable" entre los centros redox (sorprendentemente como lo haría un sistema π conjugado) y en otras como un aislante, o sea como un puente con un acoplamiento débil, típico de los puentes alifáticos.

El modelado puede predecir o estimar a un nivel de detalle profundo estas propiedades en una gran variedad de díadas donor-puente-aceptor, pero su síntesis resulta dificultosa, involucrando un mecanismo con un número elevado de etapas, partiendo de anilinas sustituidas, un mecanismo que no fue descrito hasta el presente en forma detallada, paso a paso, más allá de propuestas incompletas e incluso contradictorias. Por lo tanto, además se estudiará empleando métodos de Química Cuántica de DFT en detalle el mecanismo de reacción que lleva a la síntesis de díadas simétricas y asimétricas (Capítulo 4). Esta descripción intenta facilitar el diseño de las mejores condiciones y estrategias de síntesis sobre bases racionales, es decir conociendo cada etapa elemental de todas la vías razonables posibles para su formación.

En la segunda parte, se aplicarán métodos de modelado para comprender el mecanismo de inhibición de la proteína P-gp humana, una bomba de eflujo transmembrana del tipo ABC, que promueve la resistencia a múltiples drogas (MDR), un obstáculo fundamental que diluye la efectividad de tratamientos antitumorales, puesto que se sobreexpresa en la mayoría de los tipos de cánceres en algún estadio. Como alternativa a los inhibidores potentes pero altamente tóxicos, característica que no ha permitido su uso clínico, se partirá de compuestos aislados de plantas autóctonas y naturalizadas de la región central de Argentina. La descripción del mecanismo de inhibición a nivel molecular permitirá proponer diversas derivatizaciones a fin de aumentar la potencia de un producto obtenido de Melia azedarach y la búsqueda de compuestos por similitud química para su estudio in silico. Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración interdisciplinaria con el grupo de la Prof. María Cecilia Carpinella de la Universidad Católica de Córdoba (UCC). Los compuestos más prometedores se adquirieron o sintetizaron y se logró obtener nuevos líderes, más efectivos que el producto natural primariamente estudiado.

Abstract

Molecular Modelling methodologies are used in order to select, in some cases, and design, in others, molecules with potential applications previously targeted. In the first part, taking advantage of the unusual properties of Tröger base derivatives, its potential will be explored as different molecular devices, among them its potential application as antenna molecules for solar cells sensitized by organic dyes (organic DSSCs). These peculiarities arise from their molecular form, they being chiral even without asymmetric carbons, their "V"-shaped geometry, their considerable rigidity and, mainly, their unusual properties of selective charge transport. In particular, this last feature allows us to expect an unusual photochemistry, as it will be seen in Chapter 3. To this end, a set of possible donor / acceptor systems is proposed, bridged by Tröger bases and those that are most promising and more synthetically accessible will be chosen for an interdisciplinary study in collaboration with a group specialized in synthesis and the group headed by the Co-director, who will perform the photophysical and photochemical tests. Ultimately, a "proof of principles" system of the Donor-bridge Tröger-Acceptor system is sought with a paradigm different from the one used so far in organic DSSCs, that is to say the scheme Donor-conjugate bridge π - Acceptor. In this design, the bridge not only electronically communicates the redox centers but could also exert control over the initial charge separation, its recombination, its photophysics and even participate as a photo / electroactive nucleus. Preliminary studies in the research group, allowed to demonstrate that, sometimes, this aliphatic bridge can act as an efficient connector or "cable" between the redox centers (surprisingly as a conjugated π system would do) and in others as an insulator, that is to say as a bridge with a weak coupling, typical of aliphatic bridges.

The modeling can predict or estimate at a deep level of detail these properties in a great variety of donor-bridge-acceptor dyads, but its synthesis is difficult, involving a mechanism with a many steps, starting from substituted anilines. This mechanism was not described to the present in a detailed way, step by step, beyond incomplete and even contradictory proposals. Therefore, it will also be studied using quantum chemistry DFT methods. It was uncovered in detail the reaction mechanism leading to the synthesis of symmetric and asymmetric dyads (Chapter 4). This description tries to facilitate the design of the best conditions and strategies of synthesis on rational bases, that is to say knowing each elementary stage of all the reasonable possible pathways to its formation.

In the second part, modeling methods will be applied to understand the mechanism of inhibition of the human P-gp protein, a transmembrane efflux pump of the ABC type, which promotes the resistance to multiple drugs (MDR), a fundamental obstacle that dilutes the effectiveness of anti-tumor treatments, since it is expressed in most types of cancer at some stage. There are available potent but highly toxic inhibitors that rise enough side effects for not having allowed for its clinical use. As a convenient alternative to them, compounds isolated from native and naturalized plants from the central region of Argentina will be demonstrated to be a promising starting point. The description of the mechanism of inhibition at the molecular level

will allow proposing various derivatizations in order to increase the potency of a product obtained from Melia azedarach and the search for compounds by chemical similarity for their in sílico study. These studies were carried out in an interdisciplinary collaboration with the group of Prof. María Cecilia Carpinella at the Universidad Católica de Córdoba (UCC). The most promising compounds were acquired or synthesized and new leaders were obtained, more effective than the starting product studied.

Agradecimientos

Fueron muchos los caminos transitados en estos últimos cinco años y agradezco a quienes me acompañaron, ya sea contribuyendo a que sea más ameno y/o más desafiante, porque estas dos características que tanto me atraen, y en ocasiones van de la mano, me han ayudado a crecer desde el corazón en fortalezas, conocimientos y estrategias, otorgándome total convicción sobre mi pasión por la ciencia.

Gracias a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis. A la Universidad Nacional de Mar del Plata y en particular a la Facultad de Ciencias Exactas por brindarme una educación gratuita y de calidad. Al Departamento de Química por darme el espacio para llevar a cabo este trabajo. A CONICET, por el financiamiento otorgado en estos años. Y al INBIOTEC, por su asistencia e interesante visión de la labor científica.

Gracias a mis maestros: a mi director, Mariano, que encontró y promovió en mí desde mi condición de estudiante de Bioquímica habilidades que ni yo creía tener y siempre estuvo dispuesto a enseñar y a ayudar a resolver cada uno de los inconvenientes que fueron surgiendo, postergando hasta su sueño. Gracias a mi co-director, Carlos, y a mi hermano académico, Diego, que nunca me han dejado sola en la lucha por el saber. Gracias a todos los grupos colaboradores con los que hemos participado trabajando, ya sea dentro o fuera del tema de tesis. Me quedo con la sensación de que realmente da gusto trabajar con la calidez humana que ha atravesado mi formación doctoral. Y además, de haber visto plasmado el maravilloso término de sinergia.

Gracias a quienes me vieron renegar por demás y han confiado en mi optimismo infinito: a Samanta, por su amistad y por su aporte desde diversas áreas como mi primer tesista de grado, y gran aliada durante algunas de las batallas atravesadas para llegar a resultados de esta tesis. A Cristina, por ser para mí desde el inicio de mi carrera un ícono de perseverancia y de amor maternal. A Ale por su inteligencia y sencillez, y a sus tesistas por la compañía. A Victoria, y a los nuevos pasantes/tesistas que se sumarán que, al igual que ella, demuestran mucha tenacidad y entusiasmo para trabajar en el mundo del modelado molecular.

Modelado, diseño racional y desarrollo de compuestos de interés tecnológico y farmacológico

Gracias a todas mis amistades por confiar en mis proyectos, bancarme en mis catarsis y ayudarme en tantas ocasiones. Gracias a mi familia por alentarme desde el comienzo, por preocuparse, por frenar mi estrés con una sola palabra y por entender mis ausencias. Gracias a Mauri por la paciencia, por ofrecer soluciones desde su rol de pareja y demostrarme que es posible alcanzar cualquier meta con disciplina y entusiasmo, pero que el camino cobra un sentido más valioso cuando sea transita con amor.

Gracias a todos ellos por contribuir tanto a lo que considero mi felicidad y crecimiento personal. Espero poder devolverle al mundo algo de este gran aprendizaje.

Gracias!!

Priscila Ailín.

Índice de Abreviaturas

°C	grado Celsius
°K ó K	grado Kelvin
13 C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
A- π -D	Puente Aceptor de e- – puente pi – Dador de e-
A- σ -D	Puente Aceptor de e- – puente sigma – Dador de e-
A- σ_T -D	Puente Aceptor de e- – puente Tröger – Dador de e-
AM1	<i>Austin Model 1 method</i> Funcional híbrido, del funcional de Becke (B3) y el de correlación de Lee-Yang-Parr (LYP).
B3LYP	
BE	<i>Binding Energy</i> , energía de ligado
BET	<i>Back Electron Transfer</i>
CA	Coniferil-aldehído
CC	Coupled Cluster. Métodos CC teniendo en cuenta excitaciones simples y dobles
CCSD	<i>(Coupled Cluster Singles and Doubles)</i> .
CI	<i>Configuration interaction</i>
CN	grupo ciano
CsA	Ciclosporina A
CT	<i>charge transfer</i> o transferencia de carga
DCM	dichloromethane
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
DiCNVinil	grupo dicianovinil
DOX	doxorubicina <i>dye sensitized solar cells</i> , moléculas antena para celdas solares
DSSC	sensibilizadas por colorantes
e ⁻	electrón
eV	electron-voltio
<i>f</i>	Función de Fukui N-1 electrones
<i>f</i> ⁺	Función de Fukui N+1 electrones
FR (ó RF)	<i>Fold Reversal</i>
FIR	<i>Fluorescence intensity ratio</i>
GGA	<i>Generalized Gradient Approximation</i>
HF	Hartree-Fock
HOMO	orbital molecular ocupado más alto
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IRC	Coordenadas intrínsecas de reacción
kcal	kilocaloría
K _i	constante de inhibición
LDA	<i>Local density approximation</i>

LR	<i>Linear-Response Model</i>
LUMO	orbital molecular vacío más bajo
MDR	resistencia a múltiples drogas
MEC	concentraciones mínimas efectivas
MP	Møller–Plesset (<i>perturbation theory</i>)
MRCI	<i>Multireference configuration interaction</i>
NBD	dominio de unión a nucleótidos
OM	Orbital molecular
P-gp (h)	Glicoproteína-P (humana)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM3	<i>semi-empirical Parameterized Model number 3</i>
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfolina
ps	picosegundo
PXR	<i>pregnane-X-receptor</i>
Rho123	Rodamina 123
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
SCF	<i>self-consistent field</i>
SCRF	<i>self-consistent reaction field</i>
SS	<i>State-Specific Model (non-equilibrium solvation correction)</i>
TDDFT	Teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo
TMD	dominio transmembrana (<i>transmembrane domain</i>)
TMH	hélice transmembrana (<i>transmembrane helix</i>)
TS	<i>transition state</i> o estado de transición
UCC	Universidad Católica de Córdoba
UNC	Universidad Nacional de Córdoba
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics program</i>
xc	función de correlación e intercambio
ΔG°_b	Energía libre estándar de ligado o <i>free (standard) energy of binding</i>
Λ	Factor de acoplamiento Lambda
λ	Longitud de onda lambda

Capítulo 1 . Introducción y Objetivos

1.1 La Química Computacional y el diseño de moléculas de interés farmacológico y tecnológico

El uso de modelos químico-cuánticos está actualmente expandiéndose a grupos de distintas áreas de las ciencias químicas.

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 o propiedades aún no observados. 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 aproximaciones más duras, pero apropiados para sistemas grandes.

Ello ha llevado a la proliferación de programas que permiten obtener propiedades de cualquier molécula. Los métodos más precisos son llamados métodos *ab initio*, los cuales están basados totalmente en la teoría de 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*; y los métodos de mecánica molecular, que pueden ser aplicados en sistemas de más de 100.000 átomos

El objetivo principal de la Química Computacional es predecir e interpretar para un sistema químico sus propiedades moleculares, sus reacciones químicas y la relación de su estructura molecular con su reactividad. La utilización de ordenadores constituye una de las herramientas de más reciente incorporación en los procesos de descubrimiento de fármacos y se

ha convertido en uno de los avances más cruciales para la química del siglo XXI. Cuando se obtiene un modelo apto, se destaca la gran ventaja de robustez de análisis de la Química Computacional, lo que facilita la eficiencia en distintos campos de aplicación. La apropiada combinación y aplicación iterativa de métodos de Química Computacional, síntesis orgánica y evaluación experimental, ha proporcionado un gran número de prototipos y candidatos interesantes tanto para aplicaciones tecnológicas como farmacológicas.

1.2 Fotosensibilizadores para celdas solares

El desarrollo de nuevas tecnologías con capacidad de producir energía a partir recursos renovables (como así también su aprovechamiento racional) es una prioridad tanto a nivel nacional como internacional. Así, la síntesis y caracterización de nuevos materiales con aplicaciones en optoelectrónica se ha transformado en un área de vertiginosa actividad. Estos materiales son utilizados en la fabricación de celdas solares,^{1,2,3,4} diodos emisores de luz,⁵ transistores de efecto campo,⁶ memorias moleculares,⁷ etc.

En este marco, el diseño/fabricación de celdas solares (SC) orgánicas (o híbridas) constituye un tema de investigación muy atractivo para países en desarrollo económico-tecnológico como Argentina. En contraste con las SC basadas en silicio monocristalino, la fabricación de celdas orgánicas resulta mucho menos costosa⁸ y por ende, su producción sería abordable aún para empresas de capital medio.

Desde la publicación de O'Regan y Grätzel⁹ en 1991 proponiendo la primera celda solar (orgánica) basada en el principio de sensibilización espectral de TiO₂ coloidal usando un colorante sintético (DSSC: *Dye Sensitized Solar Cell*), pocos avances se han logrado en las eficiencias de conversión de energía. En la actualidad, la mayor eficiencia alcanzada es de ~15 %, ¹⁰ un porcentaje algo mayor al reportado originalmente por Grätzel (7-8%) pero lejos de la eficiencia teórica (30-34%).¹¹ Las razones que llevan a estas bajas han sido identificadas y discutidas extensamente. Las más importantes son: a) el rápido proceso de recombinación entre el electrón inyectado por el fotosensibilizador (FS) en el TiO₂ con el I⁻ en las DSSC o con el transportador de huecos (HC) en las ssDSSC (*solid state DSSC*), y b) la recombinación entre el electrón y el catión radical del FS y el contacto (a través del espacio o *hopping*) entre dos moléculas de colorante adsorbidas desactivándose entre ellas.¹² Diversas estrategias han sido propuestas (e implementadas) para minimizar estos procesos de recombinación de cargas.

Recientemente, Kim y col.¹² reportaron importantes progresos en esta materia en el estudio de una DSSC que usa cascadas redox para facilitar la difusión de los “huecos”, suprimiendo así, al menos en parte, los procesos de recombinación (Figurar 1.1).

Diseño racional, síntesis y ensayo de moléculas para DSSCs orgánicas

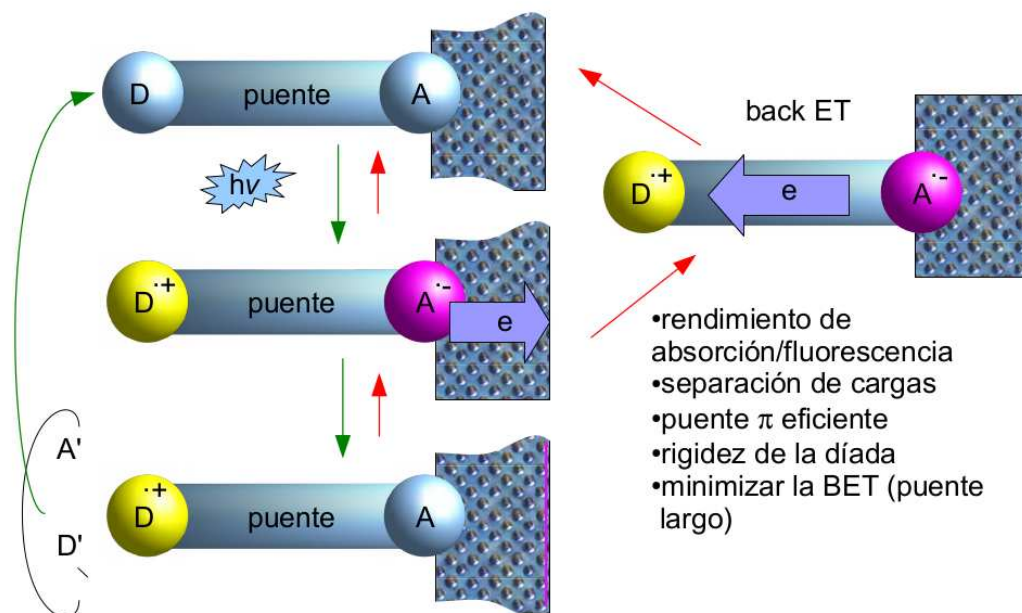
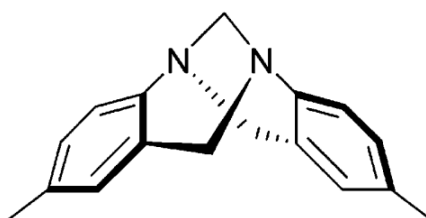


Figura 1.1. Esquema del funcionamiento de una DSSC y factores críticos para la eficiencia de la celda.

En la actualidad, la vasta mayoría de los FSs orgánicos utilizados en DSSC son cromóforos del tipo *pull-push*. Estos FSs están constituidos por un grupo aceptor (A) y un grupo dador (D) de electrones puenteados por un sistema A- π -D (es decir, con puente π). *A priori*, los orbitales moleculares (OMs) de los puentes π ($-\pi-$) siempre poseen la simetría apropiada para acoplar los centros redox; lo que significa que son excelentes transportadores de electrones y “huecos” entre los componentes de la díada. En contraste, los puentes alifáticos (puentes σ) no poseen OMs con estas características y en la práctica se comportan como aislantes.

Hace poco, se ha demostrado en el grupo que las bases de Tröger (diazocinas alifáticas) (σ T) constituyen un caso muy particular entre los puentes alifáticos. Estos puentes aportan OMs en sustratos del tipo: A- σ _T-D (con puente sigma Troger) permitiendo el acoplamiento entre los centros redox, tan eficientemente como lo hacen los puentes tipo π , pero únicamente para huecos.^{13,14}

La base de Tröger fue sintetizada por primera vez por Julius Tröger (de aquí su nombre) en el año 1887 a partir de la reacción de *p*-toluidina con formaldehído en medio ácido.¹⁵ Durante años posteriores a la síntesis de este compuesto, numerosas publicaciones intentaron dilucidar la estructura, pero tuvieron que pasar 48 años para que, en 1935, esta fuera reportada.¹⁶ Este compuesto tiene una forma de “V”, con un puente metileno entre los dos nitrógenos que forman la diazocina:



Esquema 1.1 Estructura molecular de una base de Tröger

Este plegamiento de la estructura, permite que exista quiralidad sobre dicho nitrógenos al no permitir la rotación a través de los enlaces simples. Debido a esta propiedad, las bases de Tröger han sido utilizadas para demostrar que no solo los átomos de carbono, sino también los de nitrógeno, son capaces de formar centros quirales en una molécula. La separación de los enantiómeros, fue realizada por primera vez por Vladimir Prelog.¹⁷

Las bases de Tröger han atraído la atención de la comunidad científica durante muchas décadas gracias a sus múltiples singularidades; en particular, su simetría, su quiralidad, su forma en “V” y su notable rigidez. Estos compuestos fueron utilizados en estudios apuntando a aplicaciones tales como reconocimiento molecular,¹⁸ interacciones con el ADN,¹⁹ formación de clatratos,²⁰ como auxiliar quiral en síntesis estereoselectiva,²¹ aplicaciones ópticas y optoelectrónicas,²² etc. Existen en la literatura numerosos artículos dedicados a coleccionar las rutas sintéticas de bases de Tröger simétricas, asimétricas y derivados de toda naturaleza.²³

Sin embargo, poco interés se ha prestado a las propiedades espectroscópicas de estas bases y menos aún, a las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las mismas. Recién en el año 2007 surgieron varias publicaciones insinuando su uso en la fabricación de OLEDs.²⁴ Así, las propiedades emisivas de algunas bases de Tröger fueron reportadas, tanto en solución como en el estado sólido. El dispositivo, sin embargo, nunca fue experimentado. Recientemente, se ha evaluado una díada con base de Tröger de estructura simétrica experimentalmente.²⁵

Un objetivo de esta tesis consiste en estudiar una serie de compuestos modelo basados en diádas *asimétricas* puenteadas por bases de Tröger con posible aplicación a DSSCs.

1.3 Teoría del Funcional de la densidad (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*).²⁶

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 interaccionar 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 interaccionar, $J(\rho)$ 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 Khon-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.^{27 28}

Se ha realizado un gran esfuerzo para recuperar la correlación de electrones faltantes y, como consecuencia, ha surgido una gran cantidad de métodos químicos cuánticos *ab initio*. Ejemplos de tales métodos basados en la función de onda son la teoría de perturbación de Møller-Plesset (MP), la interacción de configuración (CI), y los enfoques de CC.²⁹ Un enfoque conceptualmente diferente para incluir la correlación electrónica está representado por la teoría de la densidad funcional (DFT),³⁰ que se basa en la densidad electrónica como una cantidad fundamental.

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 Approximation*). En general, estos métodos parten del funcional LDA añadiendo términos de corrección de gradiente.⁴⁸ Para el intercambio, cabe destacar el funcional propuesto por Becke (B) en el año 1988,³¹ y para el funcional de correlación el de Perdew y Wang (PW91) del año 1991.³² Otro funcional de correlación popular es el desarrollado por Lee, Yang y Parr (LYP). 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.^{33 34}

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.¹⁴ 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,³⁵ denominado CAM-B3LYP.³⁶ 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 permiten una buena conexión entre la teoría y los resultados experimentales.

1.3.1 Teoría del Funcional de la densidad dependiente del tiempo con respuesta lineal: LR-TDDFT.

La teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TDDFT) se ha convertido en una herramienta importante para cálculos fiables de estados excitados para un amplio espectro de aplicaciones. La formulación más común de TDDFT en química cuántica se encuentra en el dominio de la frecuencia a través de la teoría de la respuesta lineal o la formulación de Casida.³⁷ TDDFT es una teoría que se basa en el análisis de la respuesta lineal dependiente del tiempo de la densidad del estado fundamental formalmente exacta a una perturbación externa dependiente del tiempo, que después de la transformada de Fourier produce las energías exactas del estado excitado y las fuerzas del oscilador. La derivación del famoso teorema de Runge-Gross y la posterior formulación de las ecuaciones de Kohn-Sham dependiente del tiempo fueron las piedras angulares en el desarrollo del formalismo de TDDFT.^{38 39}

Hoy en día, existen varios enfoques químico-cuánticos para el cálculo de estados excitados que no requieren restricciones *a priori* y que producen energías y fuerzas de oscilador de varios estados excitados en un solo cálculo.

Los métodos de estado excitado, en analogía con los métodos de estado fundamental, también se pueden dividir en métodos basados en función de onda y métodos basados en densidad de electrones. Los métodos típicos basados en la función de onda son CI, CI

multirreferencial (MRCI)⁴⁰ o aproximaciones multirreferenciales de MP,⁴¹ métodos de campo autoconsistente de configuración múltiple (MCSCF),⁴² por ejemplo, espacio activo completo SCF (CASS-CF),⁴³ y la teoría de perturbación del espacio activo completo de segundo orden (CASPT2).⁴⁴ En principio, estos enfoques se basan en la inclusión explícita de estados excitados en la función de onda de muchos cuerpos como los llamados determinantes de Slater "excitados" construidos a partir del estado base de HF mediante el intercambio ocupado con orbitales virtuales. Los coeficientes de expansión de los determinantes de Slater se calculan a través del principio variacional de Raleigh-Ritz, que en el caso de CI corresponde a la diagonalización de la matriz hamiltoniana en la base de los determinantes excitados.⁴⁵ En SCF multiconfiguracional se aproxima también a los coeficientes de expansión de los orbitales moleculares que configuran los determinantes de Slater y se reoptimizan, lo que hace que estos cálculos sean costosos para las moléculas grandes.

Otros enfoques basados en la función de onda son la ecuación de movimiento⁴⁶ y las teorías de agrupamiento acopladas de respuesta lineal (EOM-CC y LR-CC, respectivamente)⁴⁷ que dependiendo del nivel de truncamiento de la expansión de CC se pueden obtener resultados muy precisos. Todos estos métodos basados en la función de onda están limitados a moléculas bastante pequeñas debido a sus altos costos computacionales. Los métodos de estado excitado más baratos que incluyen la correlación a través de la función de onda disponible en la actualidad son el enfoque CIS (D)⁴⁸ y el esquema de CC aproximado de segundo orden (CC2).²⁷ El método CC2 es similar, las funciones de respuesta lineal producen estados excitados y fuerzas del oscilador de aproximadamente la calidad de MP2. Las implementaciones modernas de estos enfoques basados en la función de onda permiten el tratamiento de sistemas moleculares de hasta aproximadamente 50 átomos.

Entre estos métodos, TDDFT en su formalismo de respuesta lineal exhibe la mejor relación entre el esfuerzo computacional y la precisión alcanzable y, por lo tanto, se convirtió en el método de elección cuando se trata de cálculos en grandes sistemas moleculares o cuando la eficiencia computacional es crucial.

Como la función de correlación e intercambio (x_c) exacta no se conoce, las funciones de x_c aproximadas deben emplearse en un cálculo práctico. Por lo general, se emplea la aproximación de la densidad local adiabática (ALDA) y se utilizan las funciones de x_c estándar independientes del tiempo derivadas de la DFT de estado fundamental. Concomitantemente, se

introducen errores en las energías de excitación y las fuerzas del oscilador. Aún así, para la mayoría de los estados con excitación de valencia, que se encuentran muy por debajo del primer potencial de ionización, TDDFT produce resultados con una alta precisión a un costo computacional relativamente bajo en comparación con métodos altamente precisos como MRCI, CASPT2 o EOM-CCSD, que son aplicables únicamente a pequeñas moléculas de hasta 20 átomos. De hecho, la calidad de las energías de excitación a menudo se encuentra entre 0.1 y 0.5 eV en comparación con los datos experimentales.⁴⁹

La formulación de respuesta lineal de la teoría funcional de la densidad dependiente del tiempo permite el cálculo de las energías de excitación y los vectores de transición en el marco de la DFT. En la actualidad, TDDFT representa uno de los enfoques más destacados para esta tarea, especialmente cuando se están investigando estados excitados de sistemas moleculares medianos o grandes.⁴⁹

Sin embargo, dado que no se conoce el potencial de x_c local exacto, que es el ingrediente clave en los métodos basados en DFT, se debe elegir un funcional de x_c aproximado en cualquier cálculo práctico. Hay que tener mucho cuidado al usar TDDFT con funciones de x_c aproximadas debido a sus fallas en los estados de Rydberg,⁵⁰ sistemas con grandes sistemas π , estados con doble excitación y estados de transferencia de carga (CT). Existen limitaciones en la aplicación de TDDFT a sistemas grandes o moléculas pequeñas en solución, porque se producen estados excitados inter e intramoleculares de CT en la región de baja energía de los espectros electrónicos. En la actualidad, esto evita que TDDFT sea un método de caja negra para el cálculo de estados excitados. Aún existe mucha investigación dedicada a evaluar su aplicación en determinados sistemas, como así también en el desarrollo de nuevos funcionales de x_c para eliminar las fallas conocidas de TDDFT.

1.4 Diseño de fármacos

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, es la Química Medicinal.

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.

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.^{51 52}

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 más sofisticados gracias a la 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 y la Bioinformática han permitido el estudio de moléculas diana como receptores de membrana, enzimas y ácidos nucleicos. Incluso, se ha hecho posible determinar 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.^{52 53}

1.4.1 Estrategias en la búsqueda de nuevos fármacos

La mayoría de los compuestos 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.⁵²

1.5 La problemática de la resistencia a múltiples drogas (MDR) en el tratamiento del cáncer.

La resistencia múltiples drogas (MDR) es uno de los fenómenos que puede experimentar una célula para resistir a la citotoxicidad de cualquier xenobiótico y representa una de las principales causas del fracaso de la quimioterapia contra el cáncer.^{54 55} Las proteínas relacionadas con esta resistencia, son bombas de eflujo, ubicadas en la membrana plasmática, que mantienen baja la acumulación intracelular de xenobióticos.⁵⁶ En algunos tumores, la MDR aparece sin una exposición previa a fármacos anticancerosos mientras que, en otros, su aparición se produce durante el tratamiento, muy a menudo como consecuencia de la selección de células resistentes sobre las sensibles en tejidos tumorales heterogéneos.⁵⁷

Precisamente por la interferencia de la MDR en la quimioterapia contra el cáncer, un tipo particular de estas bombas, superfamilia de los transportadores ABC (*ATP binding cassette*) ha merecido especial atención.

En particular, la glicoproteína-P humana (P-gp, también conocida como HsMDR1 o ABCB1,⁵⁸ Figura 1.2) es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de transportadores ABC y posee una maquinaria molecular compleja capaz de reconocer y expulsar cientos de sustancias utilizando energía derivada de la hidrólisis de ATP. La P-gp está involucrada, entonces, en el aumento del eflujo dependiente de la energía de un amplio conjunto de fármacos citostáticos, no relacionados funcional ni estructuralmente.^{59 60 61}

La P-gp tiene una localización estratégica en varios órganos y tejidos, por lo que ejerce un papel de defensa crucial contra sustancias tóxicas, tanto de origen endógeno como exógeno, y constituye un componente esencial de varias barreras biológicas.⁶²

Posee 1280 aminoácidos distribuidos en dos mitades homólogas con una identidad de aminoácidos del 43% entre ellas. Una región enlazadora de 66 aminoácidos conecta las dos mitades de la proteína. Cada homólogo tiene seis hélices transmembrana (TM) y un dominio hidrofílico que contiene un sitio de unión a ATP, conocido como dominio de unión al nucleótido, NBD (por *nucleotide binding domain*).^{63 64} Su mecanismo de funcionamiento (de bombeo) es aún controversial, aunque los siguientes aspectos están generalmente aceptados: el mecanismo de acción comienza con la unión del sustrato a la P-gp libre de nucleótido (estado de reposo o relajado), que en este estado tiene una gran afinidad por el sustrato. La unión se produce en la región TMD inserta en la membrana. La unión de los sustratos provoca cambios

conformacionales en los NBDs que permiten la unión de una o las dos moléculas de ATP y posterior dimerización de los dos NBDs (es decir, se acercan hasta acoplarse),⁶⁵ seguida por la hidrólisis consecutiva de dos moléculas de ATP (Figura 1.2A).⁶⁶ Estas dos hidrólisis producen una reacomodación del sustrato a un estado de baja afinidad y luego su expulsión. Por último, la proteína vuelve a su estado de reposo, en el cual es capaz de ligar sustratos o inhibidores, tras la liberación de ADP y fosfato.^{67,65}

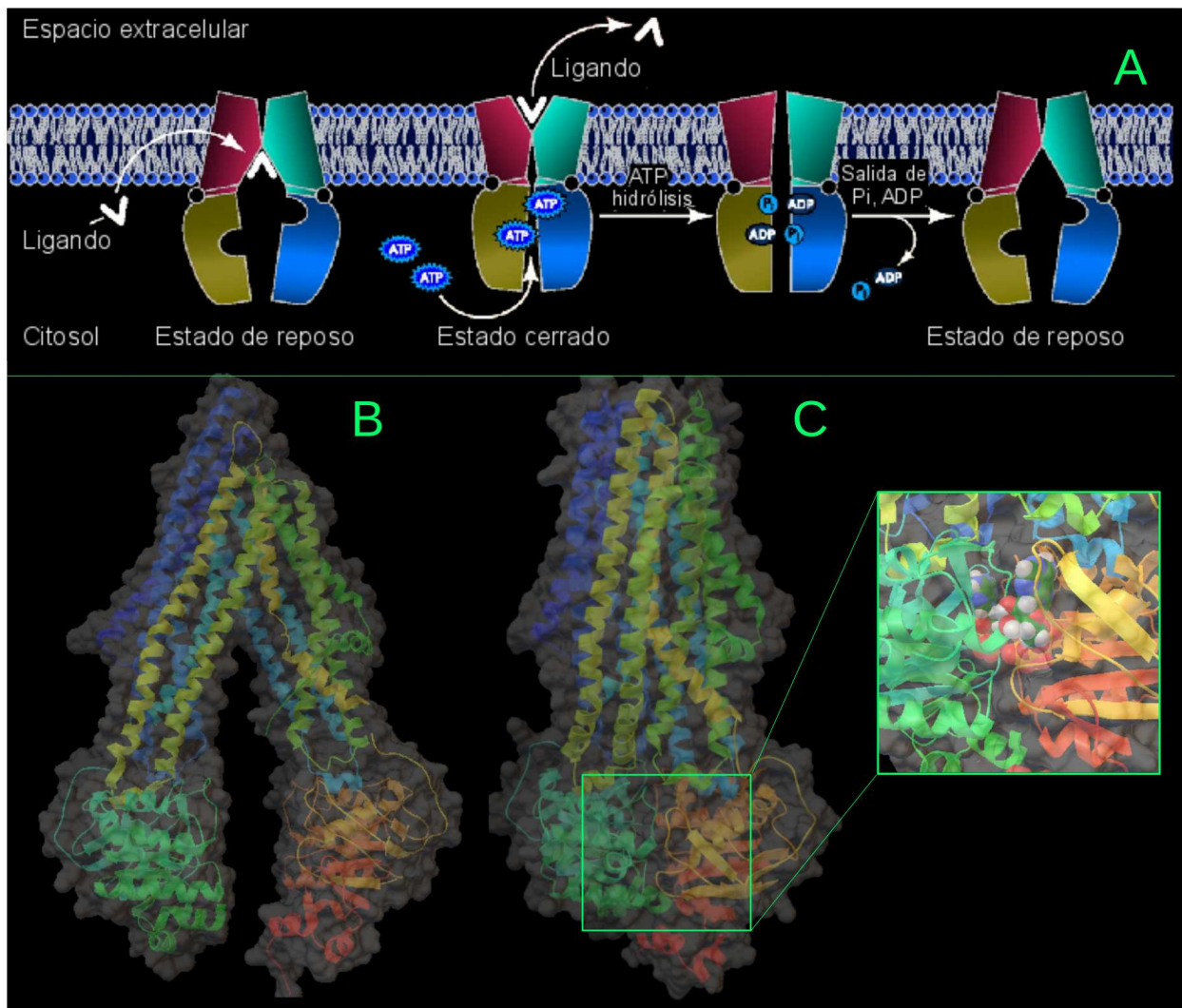


Figura 1.2. A) Mecanismo de extrusión de sustratos por parte de la P-gp. B) Modelo estructural del estado capaz de ligar sustratos (inward facing) construido en el grupo (detalles: Capítulo 2 y Capítulo 5). C) Estado cerrado (outward facing), mirando hacia el espacio extracelular; el inserto o zoom muestra aún dos moléculas de ATP en los NBDs. Este modelo estructural está en preparación en el grupo a partir de una estructura de muy baja definición por criomicrografía (resolución de 7 Å).

A través de la P-gp, las bacterias eliminan antibacterianos, los hongos eliminan antifúngicos, los parásitos, antiparasitarios y las células cancerígenas eliminan y resisten a los agentes quimioterapéuticos.⁶⁸ La función fisiológica de P-gp en humanos es proteger al organismo de toxinas en la dieta y el medio ambiente. Debido a su papel, se expresa naturalmente en intestino, hígado y riñón.⁶⁹

1.5.1 Antecedentes de la glicoproteína-P humana como blanco terapéutico

La P-gp ha llamado mucho la atención desde hace varios años, siendo sujeto de numerosos estudios fisiológicos^{70,71} tanto por su interés *per se* como modelo de sistema ABC aplicable a distintas patologías relacionadas con la MDR como por su papel en infecciones por microorganismos resistentes a múltiples drogas.^{72 73}

La sobreexpresión de P-gp se da en las células cancerosas y es responsable del flujo de varios agentes quimioterapéuticos, como los taxanos, alcaloides de la vinca, doxorubicina, etopósido, topotecan, metotrexato, imatinib, dasatinib, gefitinib entre otros.⁷⁴ Se ha reportado en más de la mitad de los tipos tumorales: cáncer de pulmón, de hígado, de páncreas, de estómago, colorrectal, renal, tiroideo, de próstata, de endometrio, carcinoides y leucemias.^{75 76} Cabe destacar que la leucemia es un trastorno maligno con un número significativo de muertes al año: ⁷⁷ con base en GLOBOCAN, en el 2018 se diagnosticaron alrededor de 437.000 nuevos casos de leucemia y 309.000 muertes ocurrieron en todo el mundo por esta afección.⁷⁸ En aproximadamente el 50% de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) que no respondía a la quimioterapia con alcaloides de Vinca y antraciclinas también se detectó la sobreexpresión de P-gp.^{79 80 81 82} Por lo tanto, la MDR mediada por P-gp es un gran obstáculo en los regímenes de quimioterapia contra numerosos tipos de cáncer.

También tiene lugar una amplia expresión de esta proteína en la superficie de las células endoteliales en la barrera hematoencefálica. Esto, por un lado, representa una protección para el sistema nervioso central (SNC) ya que previene la entrada de sustancias potencialmente dañinas, pero, desde otro punto de vista, compromete el éxito del tratamiento farmacológico de diferentes trastornos y tumores del SNC, dificultando la actividad de distintos fármacos. Más recientemente, ha surgido una relación interesante entre la P-gp y la aparición de la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la epilepsia y otras enfermedades del SNC: se observó un

deterioro en el nivel de expresión de la proteína en las primeras etapas de estos trastornos neurológicos.^{83 84}

A partir de estos antecedentes, se han realizado esfuerzos de química médica para dirigirse a la P-gp, principalmente con el objetivo de obtener inhibidores que deben administrarse conjuntamente con agentes quimioterapéuticos sometidos al flujo mediado por P-gp, lo que restaura la eficacia del tratamiento. De acuerdo con este enfoque, se han informado varios agentes de reversión de MDR, que generalmente se clasifican en tres generaciones. A pesar de los resultados prometedores *in vitro*, la mayoría fracasó en la fase de ensayo clínico por varias razones: en el caso de los agentes de primera generación que son fármacos en uso clínico para diferentes indicaciones, el principal inconveniente fue la escasa selectividad de acción.⁸⁵ Los moduladores de la segunda generación, supuestamente más selectivos, resultaron tóxicos.⁸⁶ En cuanto a los agentes de tercera generación, a pesar de su alta afinidad por la P-gp, no obtuvieron resultados satisfactorios debido a preocupaciones farmacocinéticas y de seguridad.⁸⁷ Por lo tanto, el desarrollo de nuevos agentes capaces de impedir el flujo de fármacos mediado por la P-gp sigue siendo una necesidad no satisfecha y, como la MDR continúa siendo un problema importante en la quimioterapia contra el cáncer, sigue siendo un campo de interés en la química medicinal.

Además del diseño de moduladores de P-gp para ser flanqueados a agentes de quimioterapia, varios grupos han emprendido recientemente diferentes enfoques para contrarrestar la MDR. En este sentido, una estrategia importante es el desarrollo de fármacos antitumorales que no sean sustratos de P-gp, tanto a través del diseño de nuevas moléculas como de la modificación de fármacos ya conocidos.⁸⁸ En este contexto, dada la falta de información estructural sobre el mecanismo de interacción de los medicamentos contra el cáncer con P-gp, es crítico prever la naturaleza y la posición de las modificaciones estructurales requeridas para evadir el flujo de salida de P-gp y para mantener la citotoxicidad deseable.

Otra estrategia que se ha emprendido para superar el flujo mediado por P-gp consiste en mejorar la captación del fármaco o modificar el mecanismo de captación celular mediante la conjugación no covalente o covalente de los agentes quimioterapéuticos con sistemas de direccionamiento tales como nanopartículas, liposomas, micelas, conjugados poliméricos, anticuerpos, entre otros. Se ha prestado especial atención a la formulación de liposomas y varios de estos sistemas se encuentran actualmente en evaluación clínica.⁸⁹ Se debe invertir una palabra

de precaución con respecto a este enfoque, ya que la liberación intracelular de los medicamentos de estas formulaciones aún puede resultar en un flujo de salida de P-gp. Con respecto a los derivados covalentes, las estrategias que dieron resultados interesantes consistieron en la modificación del fármaco, con la consiguiente mayor solubilidad en agua y el reconocimiento modificado por P-gp,^{90 91} y de oligopéptidos catiónicos más complejos.⁹² Además de los enfoques descritos anteriormente, basados principalmente en herramientas de química medicinal, se han intentado algunas estrategias menos exploradas para contrarrestar la MDR, apuntando a la represión (*down-regulation*) de la expresión o traducción del gen *abcb1*, como los oligonucleótidos *antisense* y el ARN pequeño interferente.⁹³

Más allá de la cuestión de la MDR, se ha propuesto la aplicación potencial en el diagnóstico temprano a través de técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) de varios trastornos neurológicos para ligandos de P-gp, en vista de la participación del transportador en el inicio de estas patologías del SNC: en particular, los sustratos radiomarcados son útiles para medir la función *in vivo* del transportador en la barrera hematoencefálica.⁹⁴

Después de los fuertes efectos de la MDR mediada por la P-gp en la quimioterapia contra el cáncer, a pesar de los obstáculos encontrados hasta ahora, el desarrollo de nuevos moduladores de la P-gp todavía aparece como una ruta valiosa y posiblemente directa para contrarrestar la MDR.

Debido a la ausencia de una estructura de rayos X de la P-gp humana, se han propuesto varios modelos de homología basados en transportadores bacterianos.⁹⁵ Tieleman *et. al*;⁹⁶ han construido uno de estos modelos basados en la estructura reciente de Sav1866.⁹⁷ Sav1866 es un transportador ABC de *Staphylococcus aureus* con función fisiológica desconocida,⁹⁸ que se ha cristalizado en una conformación similar a la que se encuentra abierta hacia afuera o *outward-facing* (es decir, es más probable que sea la conformación después de la hidrólisis de ATP y la extrusión concomitante del fármaco). Posteriormente, se obtuvo la primera estructura cristalográfica de una p-gp de mamífero. Este éxito brindó una oportunidad única para evaluar las interacciones de inhibidores nuevos y conocidos⁹⁹ en una estructura experimental de P-gp.¹⁰⁰ La P-gp del ratón (*Mus musculus*) tiene un alto grado de similitud (aproximadamente 86% de identidad de aminoácidos) con la P-gp humana y se ha propuesto convincentemente que representa un estado de reposo (libre de nucleótidos), en una conformación competente para la

unión con los ligandos,¹⁰¹ *inward-facing* o abierta hacia adentro. Más adelante, se han obtenido otras estructuras cristalografía de P-gp, como la de *Caenorhabditis elegans* con una resolución de 3.4 Å. La proteína de *C. elegans* es idéntica en un 46% a la humana.¹⁰² En el presente trabajo, se utiliza un modelo de homología humano construido a partir de la estructura experimental de P-gp de ratón, obtenido previamente por el grupo.¹⁰³

Además, durante de décadas de esfuerzo, no han estado disponibles estructuras de conformaciones tanto *inward-facing* como *outward-facing* para la misma proteína. Por ello, no se han realizado estudios de dinámica molecular computacional (MD) sobre el ciclo de transporte completo, excepto con modelos construidos.¹⁰⁴ La construcción de modelos de proteínas teniendo en cuenta la secuencia primaria y la predicción de la estructura secundaria es un recurso de gran interés farmacológico mejorar la comprensión de estos mecanismos a nivel molecular.

En 2018, se ha propuesto una estructura de la P-gp en la conformación orientada hacia el exterior, determinada por crio-microscopía electrónica en una resolución de 3,4 Å.¹⁰⁵ La resolución resulta controversial, por lo que actualmente se continúan los esfuerzos a nivel mundial para obtener estructuras con mejores resoluciones, tal es así que se ha cristalizado la P-gp de *Cyanidioschyzon merolae* en su forma *outward-facing* (1,9 Å) y en su forma *inward-facing* (3.0 Å) recientemente.¹⁰⁶

1.5.2 Hacia la búsqueda de nuevos moduladores de P-gp

Las estrategias para superar la MDR incluyen el desarrollo de inhibidores de la función P-gp que pueden actuar bloqueando la unión del sustrato a la proteína, por medio de la interacción entre el inhibidor con una región de la P-gp, evitando el eflujo o interfiriendo con la hidrólisis de ATP. Alternativamente, los inhibidores pueden actuar por mecanismos indirectos, como mediante la obstaculización de la fosforilación de P-gp o la alteración de la integridad de los lípidos de la membrana celular,^{107 108} siendo la principal hipótesis como blanco farmacéutico, la búsqueda de inhibidores a nivel de los dominios transmembrana donde se reconocen y ligan primariamente los sustratos.^{68 57 58 103}

Dado que estos inhibidores pueden controlar la extrusión de fármacos citotóxicos terapéuticos, su desarrollo resulta de gran interés como objetivos farmacéuticos.^{109 110 111} Incluso, teniendo en cuenta que algunos de los ya desarrollados presentan importantes efectos adversos y/

o son *tóxicos*,^{80 112 113 114 115} muchos investigadores se centran en la búsqueda de agentes desprovistos de estos efectos.

Desde este enfoque toma protagonismo la Fitoterapia, que es la rama del Farmacognosia que estudia drogas de origen vegetal para el tratamiento de enfermedades. Es importante destacar además que las plantas constituyen una fuente importante de moléculas bioactivas con una contribución significativa a la quimioterapia del cáncer,¹¹⁶ incluidos los inhibidores de la P-gp.¹¹⁷ La diversidad estructural excepcional de los metabolitos derivados de plantas ofrece una gran variedad de posibilidades para encontrar nuevos inhibidores de este objetivo. Como se observó con sustratos, los inhibidores de la P-gp pueden ser estructuralmente distintos,¹¹⁸ con compuestos vegetales que pertenecen a diferentes familias químicas y que son capaces de suprimir el transporte mediado por P-gp.^{119 120 121 122 123 124 125 126 127}

Aunque muchos compuestos con propiedades medicinales se han obtenido de la flora argentina,^{128 129 130} este recurso está lejos de ser completamente explorado, especialmente para compuestos con propiedades de reversión de MDR. Se considera que sólo se ha estudiado el 1% de las 9690 especies de flora vascular argentina. Entre estas especies, principalmente pertenecientes a *Asteraceae*, *Poaceae* y *Fabaceae*, se sabe que 1200 poseen propiedades medicinales.^{131 132} Los compuestos naturales han atraído una gran atención como alternativa a los inhibidores de P-gp de primera a tercera generación, cuyos efectos secundarios e interacciones farmacocinéticas observadas terminaron limitando su uso clínico. Los inhibidores de P-gp que tienen origen en productos naturales se consideran inhibidores de P-gp de cuarta generación. De hecho, la atención creciente se ha centrado recientemente en el desarrollo de fármacos multifuncionales, con la capacidad de interactuar con objetivos múltiples relacionados con una condición patológica específica.¹⁰⁸

1.6 Parte 1: Diseño, síntesis y fotofísica de sistemas donador-aceptor unidos por base de Tröger

1.6.1 Objetivos generales

Proponer un conjunto de posibles sistema donador/aceptor, puenteados por bases de Tröger.

Realizar, en colaboración con un grupo especializado en síntesis y el grupo del Codirector, ensayos fotofísicos y fotoquímicos.

Estudiar en detalle el mecanismo de reacción que lleva a la síntesis de díadas simétricas y asimétricas.

1.6.2 Objetivos Particulares

- Evaluar distintos funcionales de cálculo para la descripción de los estados de separación de carga para una serie de compuestos de tipo dador(D)-aceptor(A).
- Poner a punto protocolos teóricos que permitan abordar en profundidad el problema de la separación de carga en los estados excitados de las bases Tröger.
- Cuantificar el carácter de transferencia de carga (CT) de los estados excitados y relacionarlos con las propiedades redox de los fragmentos donador/aceptor.
- Realizar cálculos en modelo de no equilibrio para refinar la predicción de la absorción de las bases de Tröger.
- Describir en detalle el mecanismo de reacción para la síntesis de díadas con puente Tröger.

1.7 Parte 2: Desarrollo de nuevos inhibidores de glicoproteína-P humana

1.7.1 Objetivos generales

Conocer los aspectos claves relacionados con la ubicación de los sitios de unión y las interacciones moleculares P-gp-ligando y evaluar la efectividad de compuestos no tóxicos. Estos compuestos fueron seleccionados racionalmente a partir de la información del ligado del pinosresinol, compuesto aislado del extracto de *Melia azedarach*.

Para ello, se proyectó un panel de metabolitos bioactivos obtenidos de plantas nativas y naturalizadas del centro de Argentina. Se comenzó una serie de ensayos, partiendo del pinosresinol aislado del árbol *Melia azedarach* mediante la colaboración del grupo de la UCC, con amplia experiencia en la identificación y determinación experimental de actividades biológicas de compuestos aislados de plantas de nuestro país. Se han evidenciado diversas actividades biológicas del pinosresinol, entre ellas propiedades antifúngicas, antiinflamatorias, antioxidantes, neuroprotectoras e hipoglucemiantes.¹³³

De los resultados más prometedores del ligado del pinosresinol y sus posibles derivados sintéticos, se pretender ampliar el *screening* a una serie ligandos no tóxicos con similitud en la estructura química.

1.7.2 Objetivos Particulares

- Describir mediante docking molecular el sitio de unión y el modo de ligado de los inhibidores de uso farmacológico de la glicoproteína-P y del inhibidor propuesto, el pinosresinol.
- Desarrollar los posibles derivados sintéticos del pinosresinol y evaluar mediante docking molecular si es posible mejorar las constantes de inhibición mediante estas modificaciones químicas. Elegir candidatos para su síntesis y posterior ensayo *in vitro*.
- Ampliar el conjunto de potenciales inhibidores en base a su similaridad y disponibilidad sintética/comercial para los ensayos *in-vitro* (en colaboración con el grupo de la UCC).
- Obtener una versión más vívida del modelo mediante el desarrollo de una dinámica molecular del modelo de P-gp humana en solvente acuoso.
- Optimizar los protocolos para futuras simulaciones de docking y de dinámica molecular mediante el desarrollo de una dinámica molecular del modelo de P-gp humano inmerso en bicapa lipídica. Se aportará este modelo para futuras de docking y dinámica en el grupo.

- (1) a) W H. Nguyen, C D. Bailie, J. Burschka, T. Moehl, M. Grätzel, M. D. McGehee, A. Sellinger, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 1519–1525; b) C. Lindstrom, X. Zhu, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 4281–4300; c) M. Grätzel, *Nature*, 2001, **414**, 338–344; d) U. Bach, D. Lupo, P. Comte, J. Moser, F. Weissörtel, J. Salbeck, H. Spreitzer and M. Grätzel, *Nature*, **1998**, *395*, 583–585; e) J. B. Asbury, E. Hao, Y. Wang, H. N. Ghosh and T. Lian, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 4545–4557.
- (2) B J. Song, H.M. Song, I. T. Choi, S.K. Kim, K.D. Seo, M.S Kang, M.J. Lee, D.W. Cho, M.J. Ju, H. K. Kim, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 11115 – 11121.
- (3) L. Yu, J. Xi, H.T. Chan, T. Su, L.J. Antrobus, B. Tong, Y. Dong, W.K. Chan, D.L. Phillips. Novel Organic D- π -2A Sensitizer for Dye Sensitized Solar Cells and Its Electron Transfer Kinetics on TiO₂ Surface., *J. Phys. Chem. C*, **2013** *117*, 2041-2052.
- (4) A. Mishra, M.K.R. Fischer, P. Bauerle. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 2474 – 2499.
- (5) a) M. C. Gather, A. Köhnen and K. Meerholz, *Adv. Mater.*, **2011**, *23*, 233-248; b) P.-T. Chou and Y. hi, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 380-395; c) A. P. Kulkarni, C. J. Tonzola, A. Babel and S. A. Jenekhe, *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 4556-4573.
- (6) a) J. Mabeck, G. Malliaras, *Anal Bioanal Chem*, **2006**, *384*, 343-353; b) C. D. Dimitrakopoulos, P. R. Malenfant, *Adv. Mater.*, **2002**, *14*, 99-117; c) H. Siringhaus, *Adv. Mater.*, **2005**, *17*, 2411-2425; d) J. Zaumseil, H. Siringhaus, *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 1296-1323.
- (7) J. C. Scott, L. D. Bozano, *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 1452-1463.
- (8) H.S. Jung, J.-K. Le, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1682; b) J. Kalowekamo , E. Baker, *Solar Energy* **2009**, *83*, 1224.
- (9) B. Oregan, M. A. Gratzel. A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature*, **1991**, *353*, 737-740.
- (10) M. A. Green, K. Emery, Y. Hishikawa, W. Warta, *Prog. Fotovoltaics*, **2011**, *19*, 84.
- (11) G Smestad, C Bignozzi, R Argazzi. Testing of dye sensitized TiO₂ solar cells I: Experimental photocurrent output and conversion efficiencies., *Solar energy materials and solar cells* **1994** *32*, 259; y referencias allí citadas.
- (12) Z. Iqbal, W.Q. Wu, D.B. Kuang, L. Wang, H. Meier, D. Cao. Impact of hydroxy and octyloxy substituents of phenothiazine based dyes on the photovoltaic performance. *Dyes and Pigments*, **2013**, *99*, 299-307.
- (13) C. L. Ramirez, L. Trupp, A. Bruttomesso, V. T. Amorebieta, D. M. A. Vera, A. R. Parise,. Selective charge transfer in donor/acceptor systems bridged by Tröger base derivatives. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 2076-2080.
- (14) C. L. Ramirez, R. Procaccini, C. A. Chesta, A. R. Parise, D. M. A. Vera, Selective charge transfer in donor/acceptor systems bridged by Tröger base derivatives. *Organic Electronics*, **2013**, *14*, 2564-2572 .
- (15) J. Tröger. *J. Prakt. Chem.* **1887**, *36*, 225–245.

- (16) M. A. Spielman. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *57*, 583–585..
- (17) V. Prelog, P. Wieland. *Helv. Chim. Acta.* **1944**, *27*, 1127.
- (18) a) M. D. Coward, I. Sucholeiki, R. R. Bukownik, C. S. Wilcox. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6204–6210; b) M. J. Crossley, L. G. Mackay, A. C. Try. *Chem Commun*, **1995**, 1925–1927; c) Y Kubo, T. Ohno, J. Yamanaka, S. Tkita, T. Iida, Y. Ishimaru. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*: 12700–12701; d) S. Satishkuma, M. Periasamy. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 2257–2262.
- (19) a) A. Tatibouët, M. Demeunynck, C. Andraud, A. Collet *et al.* *J. Chem Commun*, **1999**, *23*, 161–162; b) M. Valík, J. Malina, L. Palivec, J. Foltýnová, M. Tkadlecová, M. Urbanová, V. Brabec, V. Král. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 8591–8600; c) N. Claessens, F. Pierard, C. Bresson, C. Moucheron, A. K. D. Mesmaeker. *J Inorg Biochem*, **2007**, *101*, 987–996.
- (20) a) C. S. Wilcox, L. M. Gree, V. J. Lynch. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 1865–1867; b) Artacho J, Nilsson P, Bergquist K-E, Wendt OF, Wärnmark K. *Chem Eur J*, **2006**, *12*: 2692–2701; c) M. Valík, R. M. Strongin, V. Král. *Supramol Chem*, **2005**, *17*, 347–367.
- (21) M. S. Sigman, D. R. Jensen. Ligand-modulated palladium-catalyzed aerobic alcohol oxidations. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 221.
- (22) R. Yuan, M. Li, J. Xu, S. Huang, S. Zhou, P. Zhang, J. Liu, H. Wu. Synthesis and optical properties of novel Tröger's base derivatives. *Tetrahedron*. **2016**, *72*, 4081.
- (23) a) S. Sergeev. *Helvetica Chimica Acta* **2009**, *92*, 415-444; b) Koene, B.E.; Loy, D.E. Thompson, M.E. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2235-2250; c) Díaz, J.L.; Dobarro, A.; Villacampa, B.; Velasco, D. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 2528-2536, d) O. V. Rúnarsson, J. Artacho, K. Wärnmark; *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 7015–7041.
- (24) a) C. X. Yuan, X. T. Tao, Y. Ren, Y. Li, J. X. Yang, W.-T. Yu, L. Wang, M. H. Jiang, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 12811; b) Q. Xin, X. T. Tao, F.Z. Wang, J.-L. Sun, D.-C. Zou, F.-J. Wanga, H.-J. Liu, Z. Liu, M. H. Jiang, *Organic Electronics*, **2008**, *9*, 1076–1086.
- (25) T. Braukyla, N. Sakai, M. Daskeviciene, V. Jankauskas, E. Kamarauskas, R. Komskis, T. Malinauskas, S. Jursenas, H. J. Snaith, V. Getautis. *The Journal of Physical Chemistry*, **2017**. *121*, 10267-10274.
- (26) Jensen, F. Introduction to Computational Chemistry. 2 edition.; Wiley: Chichester, England ; Hoboken, NJ, **2007**.
- (27) C. Haettig, F J. Weigend. CC2 excitation energy calculations on large molecules using the resolution of the identity approximation. *Chem. Phys.* **2000**, *113*, 5154.
- (28) M. Orio, D. A. Pantazis, F. Neese. Density Functional Theory. *Photosynth. Res.* **2009**, *102*, 443–453.
- (29) a) Møller, C.; Plesset, M. S. Note on an approximation treatment for many-electron systems. *Phys. Rev.* **1934**, *46*, 618. b) Bartlett, R. J. Many-body perturbation theory and coupled cluster theory for electron correlation in molecules. *Rev. Phys. Chem.* **1981**, *32*, 359. c) Carsky, P. In *Encyclopedia of Computational Chemistry*; Schleyer, P. v. R., Clark, N. L., Gasteiger, J., H. F. S., III, Schreiner, P. R., Eds.; Wiley: Chichester, U.K., **1998**; p 485; p 615. d) Kutzelnigg, W. Present and future trends in quantum chemical calculations. *J. of Molecular Structure: THEOCHEM*, **1988**, *181*, 33–54. e) Bartlett, R. J., Ed. *Modern*

Ideas in Coupled-Cluster Methods; World Scientific: Singapore, **1997**.

- (30) a) R. G. Parr, W. Yang. Density-Functional Theory of Atoms and Molecules; Oxford Science Publication: New York, **1989**. b) Dreizler, R. M.; Gross, E. K. U. Density functional theory; Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, **1995**. c) Baerends, E. J.; Gritsenko, O. V. J. A quantum chemical view of density functional theory. *Phys. Chem. A*, **1997**, *101*, 5383.
- (31) A. D. Becke. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
- (32) J. P. Perdew, K. Burke, Y. Wang. Generalized Gradient Approximation for the Exchange-Correlation Hole of a Many- Electron System. *Phys. Rev. B* **1996**, *54*, 16533–16539
- (33) P. E. M. Siegbahn. The Performance of Hybrid DFT for Mechanisms Involving Transition Metal Complexes in Enzymes. *Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 695–701.
- (34) S. Parthiban, G. de Oliveira, J. M. L. Martin. 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*, 895–904.
- (35) Y. Tawada, T. Tsuneda, S. Yanagisawa, T. Yanai, K. A. Hirao. Long-Range-Corrected Time-Dependent Density Functional Theory. *J. Chem. Phys.*, **2004**, *120*, 8425–8433.
- (36) T. Yanai, D. P. Tew, N. C. Handy. A New Hybrid Exchange– correlation Functional Using the Coulomb-Attenuating Method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.*, **2004**, *393*, 51-57.
- (37) a) M. E. Casida. In Recent Advances in Density Functional Methods; Chong, D. E., Ed.; World Scientific: Singapore, **1995**; pp 155–192. b) Casida, M. E. In Recent Developments and Application of Modern Density Functional Theory; Seminario, J. M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1996**; pp 391–439.
- (38) E. Runge, E. K. U. Gross. Density-functional theory for time-dependent systems., *Phys. Rev. Lett.* **1984**, *52*, 997.
- (39) G. Onida, L. Reining, A. Rubio. Electronic excitations: density-functional versus many-body Green's-function approaches. *Rev. Mod. Phys.* **2002**, *74*, 601–659.
- (40) a) R. J. Buenker S. D. Peyerimhoff, W. Butscher. Applicability of the multi-reference double-excitation CI (MRD-CI) method to the calculation of electronic wavefunctions and comparison with related techniques. *Mol. Phys.* **1978**, *35*, 771. b) R. J. Buenker, S. D. Peyerimhoff, P. J. Bruna. In Computational Theoretical Organic Chemistry; Csizmadia, I. G., Daudel, R., Eds.; Reidel: Dordrecht, The Netherlands, **1981**; p 91.
- (41) a) J. J. McDonall, K. Peasley, M. A. Robb. Development of a Computational Strategy in Electronic Structure Calculations: Error Analysis in Configuration Interaction Treatments. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *148*, 183. b) K. Andersson, P. A. Malmqvist, B. Roos. Second-order perturbation theory with a complete active space self consistent field reference function. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218.
- (42) R. McWeeny, B. T. Sutcliffe. Methods of Molecular Quantum Mechanics; Academic Press: London, **1969**.

- (43) B. O. Roos. The complete active space self-consistent field method and its applications in electronic structure calculations. *Adv. Chem. Phys.* **1987**, 69, 399.
- (44) K Andersson, B. O. Roos. In *Modern Electronic Structure Theory*; Yarkony, D. R., Ed.; World Scientific: New York, **1995**; Vol. 1, p 55.
- (45) A. Szabo, N. S. Ostlund. *Modern Quantum Chemistry*; Mac-Millan Publishing: New York, **1982**.
- (46) a) K. Emrich. *Nucl. Phys. A* **1981**, 351, 379. b) Sekino, H.; Bartlett, R. J. *Int. J. Quantum Chem. Symp.* **1984**, 55. c) Geertsen, J.; Rittby, M.; Bartlett, R. J. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 164, 57.
- (47) a) H. J. Monkhorst. *Int. J. Quantum Chem. Symp.* **1977**, 11, 421. b) E. Dalgaard, H. J. Monkhorst, *Phys. Rev. A* **1983**, 28, 1217. c) H. Koch, O. Christiansen, P. Jørgensen, *P. Chem. Phys. Lett.* **1995**, 244, 75. d) O. Christiansen, J. Gauss, B. Schimmelpfennig. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 965.
- (48) a) M. Head-Gordon, R. J. Rico, M. Oumi, T. J. Lee. *Chem. Phys. Lett.* **1994**, 219, 21. b) M. Head-Gordon, A. M. Grana, D. Maurice, C. A. White. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 14261.
- (49) A. Dreuw, M. Head-Gordon, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 4009-4037.
- (50) a) D. J. Tozer, N. C. Handy. Improving virtual Kohn-Sham orbitals and eigenvalues: Application to excitation energies and static polarizabilities. *J. Chem. Phys.*, **1998**, 109, 10180–10189. b) Tozer, D. J.; Handy, N. C. On the determination of excitation energies using density functional theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2000**, 2, 2117–2121.
- (51) A. Makriyannis, D. Biegel. *Drug Discovery Strategies and Methods*; CRC Press: New York, USA, **2003**.
- (52) A. D. Cirilo, C. M. Llombart, J. J. Tamargo. *Introducción a la Química Terapéutica*; Ediciones Díaz de Santos: Madrid, España, **2003**.
- (53) R. B. Silverman, M. W. Holladay. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Academic Press: San Diego, USA, **2014**.
- (54) Y. Chen, Y. Tang, C. Guo, J. Wang, D. Boral, D. Nie. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, 83, 1112-1126.
- (55) Z. Chen, T. Shi, L. Zhang, P. Zhu, M. Deng, C. Huang, T. Hu, L. Jiang, J. Li. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade., *Cancer Lett.* **2016**, 370, 153-164.
- (56) R. Krishna, L. D. Mayer. Multidrug resistance (MDR) in cancer: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs., *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 11, 265–283.
- (57) C. Swanton, Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res.* **2012**, 72, 4875–4882.

- (58) S.Y. Shin, B. H. Choi, J. R. Kim, Y. H. Lee. Suppression of P-glycoprotein expression by antipsychotics trifluoperazine in adriamycin-resistant. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 300–306.
- (59) F. J. Sharom. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem*, **2011**, *50*, 161–178.
- (60) M. L. González, D. M. A. Vera, J. Laiolo, M. B. Joray, M. Maccioni, S. M. Palacios, G. Molina, P. A. Lanza, S. N. Gancedo, V. Rumjanek, M. C. Carpinella. Mechanism Underlying the Reversal of Drug Resistance in P-Glycoprotein-Expressing Leukemia Cells by Pinorexinol and the Study of a Derivative. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*. doi:10.3389/fphar.2017.00205.
- (61) F. J. Sharom. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* **2011**, *50*, 161–178.
- (62) S. V. Ambudkar, C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna, M. M. Gottesman, P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **2003**, *22*, 7468-7485.
- (63) T.M. Loo, D. M. Clarke, Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket. *J. Biol. Chem.* **2006**, *271*, 27488–27492.
- (64) R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo, R. J. Dinis-Oliveira, E. Carvalho, M. de Lourdes Bastos *et al.* *Pharmacol. Ther.* **2015**, *149*, 1–123.
- (65) T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1575-1578.
- (66) T. W. Loo, D. M. Clarke. Vanadate trapping of nucleotide at the ATP-binding sites of human multidrug resistance P-glycoprotein exposes different residues to the drug-binding site. *PNAS*, **2002** *99*, 3511-3516.
- (67) M. Hennessy, J. P. Spiers. *Pharmacological Research* **2007**, *55*, 1-15
- (68) a) K. Linton, *Physiology*, **2007** *22*, 122-130. b) D.C. Hooper, *Clinical Infectious Diseases* **2005**, *40*, 1811-1817,
- (69) M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 48–58.
- (70) D. C. Reese, E. Johnson, O. Lewinson. *Nature Rev.* **2009**, *0*, 218-227.
- (71) S. Y. Shin, B. H. Choi, J. R. Kim, J. H. Kim, Y. H. Lee. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 300–306.
- (72) D. M. A. Vera, M. H. Haynes, A. R. Ball, D. T. Dai, C. Astrakas, M. J. Kelso, M. R. Hamblin, G. P. Tegos “Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes.” *Photochem. & Photobiol*, **2012**, *88*, 499-511.
- (73) C. Kourtesi, A. R. Ball, Y.-Y. Huang, S. M. Jachak, D. M. A. Vera, P. Khondkar, S. Gibbons, M. R. Hamblin, G. P. Tegos. Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. *The Open Microbiology Journal*, **2013**, *7*(S1 M3), 34-52
- (74) R. B. Silverman, M. W. Holladay. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action; *Academic Press* **2014**. San Diego, USA,
- (75) Y. Kuwazuru, A. Yoshimura, S. Hanada, M. Ichikawa, T. Saito, K. Uozumi, *et al.* Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in chronic myelogenous leukaemia cells in blast crisis., *Br. J.*

Haematol. **1990**, *74*, 24–29.

- (76) *The Human Protein Atlas* - www.proteinatlas.org
- (77) J.-J. Lin, H. Hsu, J. S. Yang, K.-W. Lu, R. S. C. Wu, K. C. Wu *et al.* Mechanism underlying the reversal of drug resistance in P-glycoprotein-expressing leukemia cells by pinoresinol and the study of a derivative. *Phytomedicine*, **2011**, *18*, 1075–1085.
- (78) F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* ; **2018**. *68*, 394–424.
- (79) H. Thomas, H. M. Coley. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* **2003**, *10*, 159–165.
- (80) G. Szakacs, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 219–234.
- (81) F. C. Vasconcelos, K. L. Silva, P. L. Souza, L. F. R. Silva, A. Moellmann-Coelho, C. E. Klumb, *et al.* Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of CML patients *B. Clin. Cytom.* **2011**, *80*, 158–166.
- (82) R. M. Rumjanek, R. S. Vidal, R. C. Maia. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR–CML cell lines? *Biosci. Rep.* **2013**, *33*:e00081.
- (83) W. Löscher, H. Potschka, Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases, *Prog. Neurobiol.* **2005**, *76*, 22-76.
- (84) A. H. Abuznait, A. Kaddoumi, Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 820-831.
- (85) H. Thomas, H. M. Coley, Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer Control.* **2003**, *10*, 159-165.
- (86) I. E. L. M. Kuppens, E. O. Witteveen, R. C. Jewell, S. A. Radema, E. M. Paul, S. G. Mangum, J. H. Beijnen, E. E. Voest, J. H. M. Schellens, A Phase I, Randomized, OpenLabel, Parallel-Cohort, Dose-Finding Study of Elacridar (GF120918) and Oral Topotecan in Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* **2007**, *13*, 3276-3285.
- (87) S. Shukla, S. Ohnuma, S. V. Ambudkar. Improving Cancer Chemotherapy with Modulators of ABC Drug Transporters. *Curr Drug Targets.* **2011**, *12*, 621-630.
- (88) S. Nobili, I. Landini, T. Mazzei, E. Mini, Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 1220–1262.
- (89) L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, S. Hua, Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 286.
- (90) J. R. Vargas, E. G. Stanzl, N. N. Teng, P. A. Wender, Cellpenetrating, guanidiniumrich molecular transporters for overcoming efflux-mediated multidrug resistance. *Mol. Pharmaceutics*, **2014**, *11*,

2553–2565.

- (91) C. J. McKinlay, R. M. Waymouth, P. A. Wender, Cell penetrating, guanidinium-rich oligophosphoesters: effective and versatile molecular transporters for drug and probe delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3510–3517.
- (92) P. A. Wender, W. C. Galliher, N. M. Bhat, T. H. Pillow, M. M. Bieber, N. N. Teng, Taxol-oligoarginine conjugates overcome drug resistance in-vitro in human ovarian carcinoma, *Gynecol. Oncol.* **2012**, *126*, 118–123.
- (93) M. Abbasi, A. Lavasanifar, H. Uludag, Recent attempts at RNAi-mediated Pglycoprotein downregulation for reversal of multidrug resistance in cancer. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 33–53.
- (94) N. A. Colabufo, F. Berardi, M. Cantore, M. Contino, C. Inglese, M. Niso, R. Perrone, Perspectives of P-glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1883-1897.
- (95) D.R. Stenham, J.D. Campbell, M.S.P. Sansom, C.F. Higgins, I.D. Kerr, K.J. Linton, An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived from disulfide cross-linking and homology modeling. *FASEB J* **2003**, *17*, 2287–2289.
- (96) M.L. O'Mara, D.P. Tieleman, P-glycoprotein models of the apo and ATP-bound states based on homology with Sav1866 and MalK., *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 4217– 4222
- (97) R. J. P. Dawson, K. P. Locher. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter., *Nature.* **2006**, *443*, 180-185.
- (98) S. Velamakanni, Y. Yao, D. Gutmann, Multidrug Transport by the ABC Transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus*, *Biochem* **2008**, *47*, 9300–9308.
- (99) G.F. Ecker, M. Huber, D. Schmid, P. Chiba. The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance., *Mol Pharmacol* **1999**, *56*. 791–796.
- (100) S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, et al., Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding., *Science* **2009**, *323*, 1718–1722.
- (101) D.A.P. Gutmann, A. Ward, I.L. Urbatsch, G. Chang, H.W. van Veen. Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1. *Trends Biochem Sci* **2010**, *35*. 36–42.
- (102) M.S. Jin, M.L. Oldham, Q. Zhang, J. Chen Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2012**, *490*. 566– 569.
- (103) G. E. Jara, D. M. A. Vera, A. B. Pierini. Binding of modulators to mouse and human multidrug resistance P-glycoprotein. A computational study. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *46*, 10–21.
- (104) L. Pan, S. G. Aller. Equilibrated Atomic Models of Outward-Facing P-glycoprotein and Effect of ATP Binding on Structural Dynamics. *Scientific Reports* **2015**, volume 5, 7880.
- (105) Y. Kim, J. Chen. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science* **2018**. 10.1126/science.aar7389

- (106) A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu, K. Matsuoka, Y. Kimura, K. Ueda, H. Kato. Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1. *Nature Communications*. **2019**, *10*, 88.
- (107) M. Wink. Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents. *Front. Microbiol*, **2012**, *3*, 130.
- (108) R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo, R. J> Dinis-Oliveira, F. Carvalho, M. de Lourdes Bastos, F. Remião. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *149*, 1-123.
- (109) M. N. Gruol, M. E. King, et al. Evidence for the locations of distinct steroid and vinca alkaloid interaction domains within the murine mdr1b P-glycoprotein. *Mol, Pharm*, **2002**, *62*, 1238–1248.
- (110) T. W. Loo, D. M. Clarke. *Blockage of Drug Resistance In Vitro by Disulfiram, a Drug Used to Treat Alcoholism*. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 898–902.
- (111) C. Martin, G. Berridge, C. F. Higgins, P. Mistry, P. Charlton, R. Callaghan. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Molecular Pharmacology* **2000**, *58*, 624-632.
- (112) A. F. List, K. J. Kopecky, C. L. Willman, D. R. Head, D. L. Persons, M. L. Slovak, *et al.* Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study . *Blood* **2001**, *98*, 3212–3220.
- (113) D. L. Steinbach, O. Legrand. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra?. *Leukemia*, **2007**, *21*, 1172–1176.
- (114) C. P. Wu, S. Ohnuma, S. V. Ambudkar. *Curr. Discovering natural product modulators to overcome multidrug resistance in cancer chemotherapy*. *Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*, 609–620.
- (115) Y. Z. Xia, L. Yang, Z. D. Wang, C. Guo, C. Zhang, *et al.* Schisandrin A enhances the cytotoxicity of doxorubicin by the inhibition of nuclear factor-kappa B signaling in a doxorubicin-resistant human osteosarcoma cell line. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 13972–13984.
- (116) M. Gosh, M. Thapliyal, K. A. Gurumurthi. Anticancer compounds of plant origin, in *Novel Therapeutic Agents from Plants*. eds M. C. Carpinella and M. Rai. **2009** (*Enfield: Science Publisher*), 1–35.
- (117) A. Palmeira, E. Sousa, M. H. Vasconcelos, M. M. Pinto. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1946–2025.
- (118) Eid, S. Y., El-Readi, M. Z., Fatani, S. H., Nour Eldin, E. E. M., and Wink, M. Natural products modulate the multifactorial multidrug resistance of cancer. *Pharmacol. Pharm.* **2015**, *6*, 146–176.
- (119) T. Efferth *et al.* Activity of drugs from traditional Chinese medicine toward sensitive and MDR1-or MRP1-overexpressing multidrug-resistant human CCRF-CEM leukemia cells. *Blood Cells. Mol. Dis.* **2002**, *28*, 160–168.
- (120) K. Katayama, K. Masuyama, S. Yoshioka, H. Hasegawa, J. Mitsushashi, Y. Sugimoto. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 789–797.

- (121) T. Nabekura, T. Yamaki, K. Ueno, S. Kitagawa. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure–activity relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *62*, 867–873.
- (122) Y. - L. Han, H. - L. Yu, D. Li, X.-L. Meng, Z. - Y. Zhou, Q. Yu, *et. al.* Inhibitory effects of limonin on six human cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein in vitro. *Toxicology in Vitro*, **2011**, *25*, 1828–1833.
- (123) M. Wink, M. L. Ashour, M. Z. El-Readi. Secondary Metabolites from Plants Inhibiting ABC Transporters and Reversing Resistance of Cancer Cells and Microbes to Cytotoxic and Antimicrobial Agents. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 130.
- (124) Eid, S. Y., El-Readi, M. Z., Fatani, S. H., Nour Eldin, E. E. M., and Wink, M. Natural products modulate the multifactorial multidrug resistance of cancer. *Pharmacol. Pharm.* **2015**, *6*, 146–176.
- (125) Y. Lei, J. Tan, M. Wink, Y. Ma, N. Li, G. Su. An isoquinoline alkaloid from the Chinese herbal plant *Corydalis yanhusuo* WT Wang inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associate protein 1. *Food Chem.* **2013**, *136*, 1117–1121.
- (126) Y. F. Sun, *et al.* Tetrandrine and fangchinoline, bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania tetrandra* can reverse multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein activity in multidrug resistant human cancer cells. *Phytomedicine*, **2014**, *21*, 1110–1119.
- (127) M. Zeino, M. S. Paulsen, M. Zehl, E. Urban, B. Kopp, T. Efferth. Identification of new P-glycoprotein inhibitors derived from cardiostonic steroids. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *93*, 11–24.
- (128) M. E. Chiari, D. M. A. Vera, S. Palacios, M. C. Carpinella. Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3474–3482.
- (129) M. C. Carpinella, L. De Bellis, M. B. Joray, V. Sosa, P. M. Zunino, S. M. Palacios. Inhibition of development, swarming differentiation and virulence factors in *Proteus mirabilis* by an extract of *Lithrea molleoides* and its active principle (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol. *Phytomedicine*, **2011**, *18*, 994–997.
- (130) M. B. Joray, M. R. del Rollán, G. Ruiz, S. M. Palacios, M. C. Carpinella. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina— isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. *Planta Med.* **2011**, *77*, 95–100.
- (131) Zuloaga, F., Morrone, O., and Rodríguez, D. Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. *Kurtziana*. **1999**, *27*, 17–167.
- (132) J. Alonso, C. Desmarchelier. *Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina: Bases científicas Para su Aplicación en Atención Primaria de la Salud*. Buenos Aires: Corpus Editorial. **2015**.
- (133) M. C. Carpinella, L. M. Giorda, C. G. Ferrayoli, S. M. Palacios. Antifungal Effects of Different Organic Extracts from *Melia azedarach* L. on Phytopathogenic Fungi and Their Isolated Active Components. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2506–2511.

Capítulo 2. Metodologías computacionales

A continuación se describen brevemente los métodos utilizados junto a una lista forzosamente incompleta (el 'mercado' se renueva día a día) de programas directamente relacionados con el modelado computacional y la Química Cuántica. Algunos de los programas son de distribución gratuita aunque los más completos y sofisticados tienden a ser comerciales. Todos estos han sido empleados para el desarrollo de la presente tesis.

2.1 Breve descripción de los programas de modelado computacional.

2.1.1 Programas para aplicación de métodos de DFT y métodos más avanzados

Gaussian 09: es un programa de uso muy común en Química Cuántica. Permite realizar cálculos de la energía de las moléculas a multitud de niveles de cálculo de los métodos semiempíricos AM1 y PM3 a cálculos *ab initio* al nivel Hartree-Fock o introduciendo la correlación tanto a nivel perturbativo como con métodos variacionales o de *coupled-cluster* (CC). También permite realizar cálculos a nivel DFT con diversas metodologías. En cuanto a optimizaciones de geometría es, posiblemente, el programa que permite más opciones tanto para localizar mínimos como estados de transición. También permite el cálculo de coordenadas intrínsecas de reacción (IRC) y de estados de transición (TS). Se requiere de memoria y capacidad de disco para correr el programa. El paquete Gaussian09¹ incluye herramientas como Cubegen y Cubman, que permiten operar con los resultados calculados.

2.1.2 Programas de construcción y visualización

Existe multitud de programas que permiten el dibujo de moléculas a partir de sus coordenadas (internas o cartesianas). También pueden representar diversas propiedades

resultantes del cálculo químico-cuántico como orbitales, modos normales de vibración, potencial electrostático, etc. Los siguientes fueron los más utilizados.

-MOLDEN: programa de dibujo de moléculas y de su función de onda (mapas de densidad electrónica de orbitales moleculares). Funciona en un entorno X-Windows. Permite visualizar una serie de geometrías en forma animada así como el análisis del movimiento de una vibración. Lee ficheros de salida de a mayoría de programas de cálculo como Gaussian.

-VMD (Visual Molecular Dynamics): programa diseñado para modelar, visualizar y analizar desde pequeñas moléculas hasta sistemas biológicos como proteínas, ácidos nucleicos, ensamblajes de bicapa lipídica, etc. Puede utilizarse para ver moléculas más generales, ya que VMD puede leer archivos estándar de Protein Data Bank (PDB) y descargarlos y mostrarlos. Proporciona una amplia variedad de métodos para renderizar y colorear una molécula y se puede usar para animar y analizar la trayectoria de una simulación de dinámica molecular (MD). Posee varias extensiones de análisis de datos.²⁸

2.1.3 Programas para el estudio de docking proteína-ligando

Autodock: es un software de modelado utilizado para docking molecular. Predice los modos de unión y las energías de ligandos a una proteína. La proteína debe ser una estructura de buena resolución para una estimación precisa de la energía (estructura tridimensional rígida, generalmente estructura de rayos X cristalografiada o bien un modelo de proteína construido). Incluye como interfaz al software AutoDockTools tanto para preparar archivos de entrada como para visualizar los archivos de salida y organizar los conformeros del ligando en clusters según RMSD en energía. Los dos programas principales de cálculo del paquete Autodock son el Autogrid4 y el Autodock4. El Autogrid4 calcula la energía de interacción para cada tipo de átomo del ligando con el receptor para todo el sitio de unión, el cual está discretizado a través de una cuadrícula (grilla). Esto tiene la ventaja de que las energías de interacción no tienen que calcularse en cada paso del proceso de docking. El Autodock4 realiza una búsqueda conformacional del ligando según un algoritmo escrupulosamente elegido rotando los enlaces rotables y combinando la información de esta búsqueda con los cálculos de la grilla.

2.1.4 Programas para dinámica molecular

AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement): es un paquete de software de dinámica molecular que simula un amplio número de campos de fuerza.

LEaP prepara archivos de entrada para los programas de simulación. **Antechamber** automatiza el proceso de parametrización de pequeñas moléculas orgánicas utilizando GAFF (*General AMBER force field*) que proporciona las cargas calculadas previamente por cálculos cuánticos.

Pmemd es el programa de simulación central y proporciona instalaciones para minimizar la energía y la dinámica molecular con una amplia variedad de opciones. Fue diseñado para el cómputo en paralelo. **pmemd.cuda** ejecuta simulaciones en PC con unidades de procesamiento de gráficos (GPU). **nmode** calcula los modos normales.

ptraj analiza numéricamente los resultados de simulación. AMBER no incluye habilidades de visualización, que comúnmente se realiza con Visual Molecular Dynamics (VMD). Ptraj ahora no es compatible con AmberTools 13. **cpptraj** es una versión reescrita de ptraj hecha en C++ para brindar un análisis más rápido de los resultados de simulación. Varias acciones se han hecho paralelizables con OpenMP y MPI.

MM-PBSA/GBSA permite cálculos de solventes implícitos en instantáneas de simulaciones de dinámica molecular permitiendo calcular energías libres de ligado con el modelo de Poisson-Boltzman o Born Generalizado.²

2.2 Parte 1: Diseño, síntesis y fotofísica de sistemas donador-aceptor unidos por base de Tröger

La minimización de cada estructura y los cálculos fotofísicos (que incluyen el cálculo de absorción y la optimización de los estados excitados) fueron obtenidos empleando el paquete Gaussian 09.¹ Se ensayaron varios funcionales (detalles Cap. 3) siendo el utilizado extensivamente el CAM-B3LYP, un funcional híbrido con correcciones de largo alcance (*long-range corrected*), que minimiza los problemas de sobredeslocalización de cargas merced a la variación de la proporción de mezcla de intercambio de Hartree-Fock y de DFT, con predominancia de HF a distancias largas y DFT a distancias interelectrónicas cortas.³⁶

Para los cálculos fotofísicos se utilizaron dos modelos de solvatación dentro del esquema de modelos de solvente SCRF (*“self-consistent reaction field”*), con la implementación IEFPCM de Gaussian09.³ En primera instancia el modelo *“Linear Response”* de equilibrio (LR) y luego con el modelo *“State Specific”* (SS) en el nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p). La corrección SS permite obtener transiciones realmente verticales (solvatación de no-equilibrio) puesto que el estado de llegada (S_1 , p. ej. en la absorción) encuentra la componente electrónica de

polarización de solvente (dieléctrico) todavía en el estado con el que estabilizaba al soluto en el estado de partida (S_0 , p. ej. en la absorción).⁴ Para la evaluación del solvatocromismo se realizaron cálculos en n-hexano, acetato de etilo, diclorometano y acetonitrilo (nombrados según constante dieléctrica creciente).

Las diferencias de densidad electrónica entre el estado fundamental y los estados excitados de cada díada fueron calculadas, los potenciales electrostáticos y los cálculos de extensión o grado de alcance (Λ , siguiente sección) con la herramienta Cubegen y scripts desarrollados para automatizar las integrales.

2.2.1 Cálculos del grado de transferencia de carga⁵

Para cuantificar la extensión o grado de transferencia de carga (o de "no localidad") de la transición para cada estado excitado de interés se utilizó la definición Λ , empleada en diferentes estudios de complejos de transferencia de carga (CT).⁵

$$\Lambda = \frac{\sum_{i,a} \kappa_{ia}^2 \int |\phi_i(\mathbf{r})| |\phi_a(\mathbf{r})| d\mathbf{r}}{\sum_{i,a} \kappa_{ia}^2}$$

donde los κ_{ia} son los coeficientes con los que contribuye cada componente de la matriz de coeficientes de TDDFT, pesando la transición desde cada orbital ϕ_i de partida a cada ϕ_a de llegada; con valores de $0 < \Lambda < 1$, siendo valores próximos a 1 correspondientes a transiciones locales (es decir en un mismo centro de la díada o en general del sistema π del colorante) y decreciendo a medida que aumenta el carácter de CT y la longitud del puente y/o el acoplamiento electrónico entre los centros donador y aceptor. Las integrales se evaluaron empleando cubos de 80x80x80 generados con la herramienta cubman del gaussian y visualizados con Gabedit 2.4.8.⁶

La teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TDDFT),⁷ en la aproximación adiabática, se usa ampliamente para el cálculo de las energías de excitación electrónica. Para la aproximación de gradiente generalizada convencional de funcionales GGA e híbridos, está bien establecido que las excitaciones locales son generalmente precisas dentro de algunas décimas de eV, mientras que las excitaciones Rydberg y de CT son más problemáticas. Este parámetro se utiliza para la discusión de este tipo de transiciones en el Capítulo 3 a para comparar el que tan 'no locales' resultaron los estados en comparación con díadas π conjugadas convencionales en bibliografía.

2.2.2 Aplicación del teorema de Koopmans⁸

El teorema de Koopmans establece que en la teoría de HF de capa cerrada, la primera energía de ionización de un sistema molecular es igual al negativo de la energía del HOMO. Este teorema recibe su nombre de Tjalling Koopmans, quien publicó este resultado en 1934. El teorema de Koopmans es exacto en el contexto de la teoría restringida de Hartree-Fock si se supone que los orbitales del ion son idénticos a los de la molécula neutra (aproximación de orbital congelado). Las energías de ionización calculadas de esta manera están en acuerdo cualitativo con el experimento: la primera energía de ionización de moléculas pequeñas a menudo se calcula con un error de menos de dos electronvoltios. Por lo tanto, la validez del teorema de Koopmans está íntimamente ligada a la precisión de la función de onda HF subyacente. Las dos fuentes principales de error son la relajación orbital, que se refiere a los cambios en el operador Fock y los orbitales HF cuando se cambia el número de electrones en el sistema, y la correlación de electrones, refiriéndose a la validez de representar la función de onda de muchos cuerpos utilizando la función de onda HF es decir, un único determinante de Slater compuesto de orbitales que son las funciones propias de la autofunción del correspondiente operador de Fock.

Las comparaciones empíricas con valores experimentales y cálculos *ab initio* de mayor calidad sugieren que en muchos casos, pero no en todos, las correcciones energéticas debidas a efectos de relajación casi cancelan las correcciones debidas a la correlación de electrones.

Existe un teorema similar en DFT a partir de la discontinuidad del sistema de N y $N\pm 1$ electrones y el teorema de Janak⁹ para relacionar la primera energía de ionización vertical exacta y la afinidad electrónica con las energías HOMO y LUMO de los orbitales de Kohm-Sham, aunque tanto la derivación como la afirmación precisa difieren de la del teorema de Koopmans. En la práctica la aplicación es idéntica y también se tienen problemas al relacionar LUMOs y afinidades electrónicas.¹⁰

2.2.3 Gap Redox más allá de la aproximación de Koopmans

Las energías de ionización calculadas a partir de energías orbitales DFT son generalmente más pobres que las del teorema de Koopmans, con errores mucho mayores que dos electronvoltios, dependiendo de la aproximación de correlación de intercambio empleada. La energía LUMO muestra poca correlación con la afinidad electrónica con aproximaciones típicas

^{10,11}. Como se propuso anteriormente, ¹² los potenciales de ionización y afinidades electrónicas pueden calcularse, y lo que es más complejo, sus potenciales de oxidación y reducción en un solvente dado también, con exactitud del orden de pocos meV, empleando las energías totales en el medio dado con funcionales como el CAM-B3LYP. El gap redox, ($IP - EA$) en solución (diferencia entre la afinidad electrónica y el potencial de ionización) entre los extremos donador/aceptor (Z y Y respectivamente), fue evaluado empleando la definición en base a energías totales como

$$IP^{(solvente)} - EA^{(solvente)} = \Delta G_{red}^0(Y|Y^{\cdot-}) + \Delta G_{ox}^0(Z^{\cdot}|Z) = 2\eta^{(solvente)}$$

donde que los ΔG^0 corresponden a las energías libres de formación de los productos semioxidados/semireducidos ¹³ y η a la dureza química en el solvente dado.

2.2.4 Análisis de las densidades electrónicas.

Las densidades de transición utilizadas para las representaciones de las transiciones electrónicas del Capítulo 3 y el cálculo de las Λ antes mencionadas se utilizaron un conjuntos de *scripts* desarrollados para tal fin y la utilidad de cubegen del Gaussian09. En el estudio del mecanismo de reacción (Cap. 4) se utilizaron como guía para la construcción de modelos de complejos de encuentro plausibles y ahorrar tiempo computacional mediante visualizaciones de potencial electrostático molecular y análisis de orbitales naturales de enlace, sobre todo para juzgar la fuerza de puentes hidrógenos en estados de transición usando el módulo NBO¹⁴ de Gaussian09 y en ocasiones del PQS4.0.¹⁵

Como indicadores de reactividad / regioselectividad se utilizaron las funciones de Fukui definidas de la aproximación de la discontinuidad:¹⁶

$$\left(\frac{\partial \rho(r)}{\partial N}\right)_{v_{ext}}^+ \approx \left(\frac{\Delta \rho(r)}{\Delta N}\right)_{v_{ext}}^+ \approx \frac{\rho_{N+1}(r) - \rho_N(r)}{(N+1) - N} = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r) \equiv f^+(r)$$

$$\left(\frac{\partial \rho(r)}{\partial N}\right)_{v_{ext}}^- \approx \left(\frac{\Delta \rho(r)}{\Delta N}\right)_{v_{ext}}^- \approx \frac{\rho_N(r) - \rho_{N-1}(r)}{N - (N-1)} = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r) \equiv f^-(r)$$

donde $\rho_N(r)$ es la densidad de la especie en cuestión, $\rho_{N+1}(r)$ es la densidad electrónica de su radical anión sobre las coordenadas de equilibrio de la molécula neutra (porque v_{ext} , potencial de los núcleos, es constante), $\rho_{N-1}(r)$ la del radical catión, y el valor de f^+ y f^- darán idea de cuáles

son las zonas del espacio preferenciales para el ataque de un electrófilo o un nucleófilo, respectivamente.

Cuando se usaron estos gráficos se utilizaron las densidades totales (multielectrónicas) en vez sus formas aproximadas (densidades de un electrón) basadas en los orbitales de Kohm-Sham de HOMO y LUMO,¹⁷ puesto que de este modo se aprovecha a pleno la precisión de los funcionales para describir las especies de capa abierta, sin los problemas de la aproximación de Koopmans.¹⁸

2.2.5 Estudio de mecanismo de reacción de díadas con base de Tröger

La exploración de la superficie de energía potencial se realizó utilizando el paquete Gaussian09 para los cálculos DFT. Todas las estructuras de reactivos, estados de transición (TS), intermediarios y productos se optimizaron con el modelo de solvente SCRF-IEFPCM¹⁹ en ácido acético en el nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) y se caracterizaron mediante la diagonalización de la matriz hessiana y análisis de frecuencias armónicas para obtener correcciones térmicas y de punto cero para la energía, la entalpía y la energía libre. La energía libre relativa utilizada en las discusiones se define como la energía libre estándar de la especie en cuestión menos la energía libre estándar de los reactivos de partida, tomados como referencia ($\Delta G^0_r=0$)

En casos relevantes (o bien en los TS más difíciles de hallar), se iniciaron las simulaciones IRC (*uphill/downhill*)²⁰ a partir de los modos normales de vibración computados en los TS, utilizando coordenadas ponderadas por masa y coordenadas distinguidas de reacción, en algunas ocasiones seguidas de búsquedas por QST2.²¹ Estos pasos fueron realizados a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-31G* para luego emplear las estructuras obtenidas como geometrías iniciales para continuar con la base 6-311+G(d,p) con el algoritmo Berny,²² con pequeños incrementos de 0.018 unidades atómicas en el máximo desplazamiento y recálculo de la Hessiana cada 20 o 30 pasos.

El nivel de teoría utilizado se espera que sea satisfactorio, ya que ya fue empleado por el grupo para otros estudios de reacciones de condensación para síntesis de heterociclos complejos exitosamente y con energías libres relativas comparables a las obtenidas a nivel MP4(DQ)²³ y CCSD(T);²⁴ este último, una de las metodologías *ab initio* puras (no extrapolativas) más exactas en términos prácticos para sistemas orgánicos de tamaño medio.²⁵ En particular se

demonstró que las máximas desviaciones en estados de transición estuvieron por debajo de 2.5 kcal/mol respecto del nivel CCSD(T)/6-311G(d,p).^{26 27}

Las visualizaciones y las representaciones gráficas se realizaron con Molden, Gabedit 2.4.8 y VMD 1.8.9.²⁸

2.3 Parte 2: Desarrollo de nuevos inhibidores de glicoproteína-P humana

2.3.1 Elección del modelo de P-gp humana

Se seleccionó como estructura proteica confiable de partida a un modelo de homología humana de la P-gp construido previamente por el grupo de trabajo a partir del 3G5U (estructura de ratón).²⁹ Este modelo de la P-gp humana (P-gp(h)) fue validado en diferentes simulaciones y permitió obtener buen acuerdo con resultados experimentales para otras familias de inhibidores. Luego de la optimización, los parámetros estructurales de la proteína se validaron usando el programa PROCHECK.²⁴, donde se obtuvo un gráfico de Ramachandran el cual ubicó más del 84% de los aminoácidos en las regiones muy favorecidas, el 15% en las regiones favorecidas y 0,8% en las no favorecidas. El RMSD correspondiente al *backbone* fue de 0,77Å comparada con la estructura experimental de la P-gp de ratón. Las estructuras terciaria y cuaternaria fueron validadas siguiendo un procedimiento similar al informado por Globisch *et al.*, en el que las distancias entre los aminoácidos del modelo se comparan con aquellas obtenidas a través de datos experimentales obtenidos por *cross-linking* de cisteínas.^{30 31} Esta última observación permitió confirmar que el modelo usado, es una muy buena aproximación a la estructura en estado de reposo. Se chequeó la distancia entre aminoácidos y se realizó una regresión lineal con datos experimentales. Estas comprobaciones constan en la referencia 30.

2.3.2 Ligandos seleccionados para el docking molecular

Los siguientes ligandos fueron dockeados en el modelo estructural de la P-gp(h):

- Pinoresinol y derivados de pinoresinol, como 1-acetoxi-(+)-pinoresinol, 1-acetoxi(-)-pinoresinol, 1-hidroxi-(+)-pinoresinol, filigenina, pinoresinol diglucósido y (+)-pinoresinol-4-glucósido. Estos compuestos fueron elegidos en base al análisis de los resultados obtenidos con el pinoresinol (Cap. 4) y su factibilidad dentro de las posibilidades de los laboratorios de la UNMDP y la UCC, ya sea adquiriéndolos o por derivatización del pinoresinol. El (Z)-3-(4-hidroxi-3-

metoxifenil)-2-propenal, que se encontró inactivo, se usó como el control negativo (nombrado en adelante como coniferil aldehído o CA).

- El tariquidar (XR9570), inhibidor de tercera generación con la actividad más fuerte *in vitro* (aunque tóxico, no descartado para su uso clínico), utilizado como control positivo y referencia.
- Verapamilo, un inhibidor conocido de primera generación de actividad moderada utilizado como referencia en los experimentos.³²
- Doxorubicina (DOX) y rodamina 123 (Rho123), utilizados como sustratos modelos en los experimentos.

Se espera que los compuestos que sean potenciales inhibidores imiten el modo de ligado de los compuestos conocidos como inhibidores poderosos, como se ha tenido en cuenta en trabajos previos realizados por el grupo.^{30 33}

Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura 5.1.

2.3.3 Screening de análogos a pinosinol

Posteriormente, en función de los resultados obtenidos, se investigó un segundo y más amplio panel de compuestos análogos a pinosinol, antagonistas sintéticos de *pregnane X receptor* (PXR) en virtud de la colaboración con un grupo con experiencia en la síntesis de estas especies.

Se realizó un screening de la base de datos ZINC para sumar otros posibles inhibidores de P-gp utilizado como una consulta para una búsqueda de similitud 3D con la estructura de los compuestos encontrados en la etapa anterior.

Se evaluaron en esta instancia unos 34 compuestos. Tanto para la familia de antagonistas de PXR como para 25 de los compuestos provenientes de ZINC, el criterio de filtro fue la similaridad con el pinosinol, utilizando el índice de similitud de TanimotoCombo con el software ROCS.³⁴

Además de controles negativos (compuestos no activos, sólo se discutirá uno de ellos) usados en docking y en ensayos experimentales, y además del tariquidar utilizado como control positivo, se añadieron otros dos controles positivos que también fueron estudiados experimentalmente y sus parámetros cinéticos se obtuvieron en las mismas condiciones experimentales en la UCC: el tamoxifeno (que además es un antitumoral conocido) y la

ciclosporina A (CsA) (Cap. 6). De este modo, se usaron en las mismas condiciones experimentales al panel de 5 controles negativos y 3 controles positivos (verapamilo, tamoxifeno y CsA)

Las estructuras de este panel estudiado en el Capítulo 6, se muestra en las Figuras. 6.1-6.3.

2.3.4 Optimización de los ligandos

Las estructuras de los ligandos fueron obtenidas mediante optimizaciones con nivel de teoría semiempírico PM6,³⁵ caracterizando las estructuras como mínimos en la superficie de energía potencial por la diagonalización de la matriz Hessiana y asegurando la ausencia de autovalores negativos. Luego se hizo un refinamiento con el funcional híbrido CAM-B3LYP con bases hasta 6-31+G(d)³⁶ con el programa Gaussian 09.

2.3.5 Docking Molecular

El programa utilizado fue el *Audodock 4.2.6*³⁷. La búsqueda conformacional para cada ligando se llevó a cabo sin previas suposiciones sobre la localización de un sitio de unión en particular. Durante el docking molecular se evaluó todo el dominio transmembrana (TMD), asegurándose de incluir la región inmersa en la bicapa, utilizando los aminoácidos triptófano como referencia. Las grillas (*gridmaps*) se tomaron con espaciamiento de 0.28 Å. El pinoresinol y sus análogos propuestos en el Cap. 5 fueron también dockeados en las dos regiones de los NBD para checkear la hipótesis de un posible mecanismo de inhibición relacionado con el ligado de ATP.

Los confórmeros de docking más estables de cada ligando fueron seleccionados mediante un algoritmo genético Lamarckiano, creando 150-200 individuos por generación con límites de 10^5 generaciones con un sobreviviente por generación y un límite de 6×10^6 evaluaciones de energía. De esta forma, se hicieron 4000 corridas del algoritmo genético obteniendo un confórmero por cada una para cada ligando. El número inusualmente alto de corridas se debe a la extensión del dominio transmembrana. Se presentó un análisis de cluster para los complejos ligando-proteína empleando un RMSD de 2.5 Å con el Autodock-Tools. Las representaciones gráficas de los complejos ligando-proteína se estudiaron con el visualizador VMD 1.9.2³⁸.

2.3.6 Comparación de estudios *in-sílico* e *in-vitro*

Los resultados hallados con la metodología descrita se contrastaron con algunos de los resultados experimentales para intentar caracterizar dos aspectos de interés: las energías involucradas en la inhibición y el tipo de inhibición de los compuestos ensayados. Los ensayos experimentales fueron realizados por el grupo colaborador de la UCC y se nombran a continuación :

- Estudio sobre la expresión superficial de P-gp.
- Ensayo de acumulación intracelular de DOX.
- Modulación del eflujo de DOX.
- Modulación del eflujo de rodamina-123.
- Determinación de la actividad ATPasa.
- Estudio sobre la expresión superficial de la P-gp.
- Actividad *in vitro* del 1-acetoxi-(+)-Pinoresinol.
- Citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).³⁹

2.3.6.1 Ensayo de acumulación intracelular: reversión de la MDR vía IC₅₀ de DOX

Este es uno de los experimentos *in vitro* realizados en paralelo el grupo colaborador de la UCC y se describe brevemente. El efecto de reversión al mecanismo MDR, se puede medir indirectamente sobre un descenso de la IC₅₀. La IC₅₀ es la concentración de DOX requerida para inhibir el 50% de la proliferación celular. La retención del dentro de las células se usa comúnmente para medir la capacidad de una sustancia para inhibir el transporte hacia el exterior mediado por P-gp. La inhibición del flujo de salida se correlaciona positivamente con la concentración intracelular.

El grupo colaborador de la UCC empleó dos líneas celulares de leucemia: Lucena 1 (caracteriza a la MDR por sobreexpresar P-gp) y K562 (subexpresa P-gp, como control para que el descenso en la IC₅₀ no se deba a otros procesos) .

Para obtener más información acerca de los mecanismos, se utilizó el (+)-pinoresinol y su comportamiento se analizó por Lineweaver-Burk, de dobles recíprocas comparado con los datos en ausencia de inhibidor.⁴⁰

La tasa de retención del fármaco se graficó versus la concentración de DOX y se ajustó a la ecuación de *Michaelis-Menten*:

$$R = R_{max} [S]/K_m + [S], \text{ (Ec.2.1)}$$

donde R es la tasa de retención del fármaco, [S] es la concentración del sustrato y K_m es la constante de Michaelis del eflujo de DOX.

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (SE). Los datos se analizaron usando el test-T de Student o un análisis de varianza de dos vías (ANOVA).³⁹

41

2.3.7 Dinámica del modelo de P-gp(h) en medio acuoso

La parametrización de la proteína, sus minimizaciones y dinámicas se realizaron mediante el empleo de las herramientas de AMBER 14. El armado de la topología de este sistema se desarrolló con la herramienta *XLEAP* del paquete AMBER 14. El campo de fuerza utilizado fue el *ff14SB*. La proteína fue inmersa en una caja cúbica, solvatada con moléculas de agua del modelo *TIP3P* y el sistema fue neutralizado con contraiones Cl⁻.⁴²

La minimización inicial contó con un primer paso en el que sólo se minimizó el solvente manteniendo restringida la estructura proteica, este cálculo se desarrolló en procesadores CPU con *pmemd*. Los subsiguientes pasos de minimización y dinámica se realizaron en GPUs mediante *pmemd.cuda*,⁴³ haciendo uso de la placa NVIDIA® Tesla K40c. A partir de esta instancia, se procedió a minimizar el sistema molecular completo con un número máximo de 5000 ciclos de minimización de gradiente conjugado. Luego se continuó con el fin de equilibrar el sistema, realizando un calentamiento lento a lo largo de 50 ps mediante termostato de Langevin, sin escala de presión y a volumen constante, restringiendo la movilidad de la proteína con una restricción armónica de 50.0 kcal/Å², incluyendo un número de 150 ps de dinámica molecular y con un paso de integración de 0.002 ps. Posteriormente se llevó a cabo una trayectoria de dinámica molecular de 2 ns restringiendo la movilidad de los átomos del *backbone*

(restricción armónica de $10.0 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$). Luego se agregó una etapa de producción de más de 15 ns con paso de integración de 0.002 ps.

El análisis de las trayectorias se elaboró con la herramienta del AMBER, *cpptraj*. El paquete del VMD 1.9 también fue utilizado para la visualización y la representación de los gráficos, evaluando RMSD de los átomos del *backbone* a lo largo de toda la simulación.

2.3.8 Protocolo de docking flexible.

Este protocolo se diseñó para permitir, de una manera *ad hoc*, introducir un cierto grado de flexibilidad al docking convencional, con la proteína “congelada” en determinados momentos de la trayectoria de dinámica molecular. Se llevó un análisis de clusters entre los 5ns y 10ns de simulación de la P-gp en medio acuoso (en donde el RMSD se encontró estabilizado). La elección de clusters se realizó con la herramienta *cpptraj* del AMBER mediante la ejecución de *cluster.cpptraj* estipulando un *output* de 10 estructuras en formato PDB (seleccionadas por criterio de RMSD de la trayectoria aportada como *input*). El objetivo fue obtener un conjunto de estructuras, lo más diferentes posibles, todas de baja energía a fin de tener “instantáneas” de configuraciones del modelo de proteína de P-gp(h) frecuentemente visitadas a temperatura ambiente.

Estas estructuras obtenidas se usaron para realizar docking nuevamente (en adelante, *docking dinámico*), repitiendo el protocolo anterior con estructuras de P-gp seleccionadas del análisis de clusters y seleccionar las posiciones de menor energía testeadas en un espacio conformacional más amplio. Se evaluó si el modo de ligado, el sitio de unión y/o la energía de binding fueron modificados al tener en cuenta la flexibilidad de la proteína simulada vía dinámica molecular. Se eligieron como ligandos para realizar el docking dinámico al tariquidar como referente y a uno de los mejores compuestos propuestos en esta etapa (compuesto 26).

2.3.9 Desarrollo de una dinámica de proteína inmersa en bicapa lipídica.

La membrana plasmática en la que actúa la proteína se modeló en parte utilizando la plataforma *Charmm-GUI* (<http://www.charmm-gui.org>). Se construyó una membrana POPC con la proteína ya inmersa en ella, compuesta por 287 lípidos, además de 60000 moléculas de agua y suficientes iones K^+ y Cl^- para integrar una fuerza iónica equivalente a 0.075 M. El alineamiento fue hecho manteniendo el eje de inercia Z del modelo de la P-gp(h) perpendicular al plano de la membrana y debió ajustarse el eje para que la membrana esté delimitada por los residuos

triptófano.⁴⁴ Construida la bicapa se ensambló la membrana y solvente (incluyendo el poro donde irá la proteína) con la proteína utilizando la herramienta de construcción *tleap* de AMBER14 y posterior combinación de los campos de fuerzas *ff14SB*⁴⁵ y *LIPID14*.⁴⁶ El protocolo de estabilización de el sistema global involucró:

- i) 5000 etapas de minimización de gradiente conjugado de las aguas y contraiones con la membrana y la proteína constreñidos armónicamente (constante de fuerza de 50 kcal/Å²).
- ii) 5000 etapas de minimización de *steepest descent* de las aguas y los lípidos con la proteína constreñida (50 kcal/Å²).
- iii) 20000 etapas de minimización del sistema global.
- iv) Calentamiento del sistema a volumen constante de 0 a 100 K en 20 ps con la proteína y los lípidos constreñidos (constante de fuerza de 20 kcal/Å²). Control de temperatura de Langevin. Control relajado del volumen en el plano XY.
- v) Calentamiento del sistema presión constante con control anisotrópico de Berendsen de presión y control de temperatura de Langevin de 100 a 303 K con la proteína y los lípidos constreñidos (constante de fuerza de 20 kcal/Å²).
- vi) 5 etapas de 10 ns. Presión (anisotrópica) y temperatura constantes a 303°K con la proteína constreñida (20 kcal /Å²).
- vii) 20 ns a presión (anisotrópica) y temperatura constantes con el *backbone* de la proteína constreñido (10 kcal /Å²).
- viii) Dinámica de producción: Equilibración del sistema a presión y temperatura constante sin restricciones en bloques de 50 ns con análisis del área por lípido, análisis energético y del RMSD de la proteína.

- (1) Gaussian 09, Revision A.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- (2) S. Genheden, U. Ryde. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities *Expert Opin Drug Discov.* **2015**, *10*, 449–461
- (3) J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi, Quantum mechanical continuum solvation models, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2999-3093.
- (4) a) R. Improta, V. Barone, G. Scalmani, M. J. Frisch, A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional method for excited state calculations in solution, *J. Chem. Phys.*, **2006**, *125* 054103: 1-9. b) R. Improta, G. Scalmani, M. J. Frisch, and V. Barone, Toward effective and reliable fluorescence energies in solution by a new State Specific Polarizable Continuum Model Time Dependent Density Functional Theory Approach, *J. Chem. Phys.*, **2007**, *127*, 074504: 1-9.
- (5) M. J. G. Peach, P. Benfield, T. Helgaker, D. J. Tozer, “Excitation energies in density functional theory: An evaluation”, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 044118.
- (6) A.R. Allouche, Gabedit - A graphical user interface for computational chemistry softwares, *J. Comput. Chem.*, **2011**, *32*, 174-182.
- (7) A. D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648
- (8) T. A. Koopmans. Ordering of wave functions and eigenenergies to the individual electrons of an atom. *Physica*, **1933**, *1*, 104.
- (9) Janak, J. F. Proof that $\partial E/\partial n_i = \epsilon$ in density-functional theory. *Phys. Rev. B*, **1978** *18*, 7165.
- (10) D. M. A. Vera and A. B. Pierini. Species with negative electron affinity and standard DFT methods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 2899-2994.
- (11) M. Puiatti, D. M. A. Vera, A. B. Pierini. Species with negative electron affinity and standard DFT methods. Finding the valence anions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008** *10*, 1394-1399.
- (12) M. Puiatti, D. M. A. Vera, A. B. Pierini. In search for an optimal methodology to calculate the valence electron affinities of temporary anions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 9013-9024.
- (13) McWeeny, R.; Sutcliffe, B. T. *Methods of Molecular Quantum Mechanics*; Academic Press, **1969**. London.

- (14) E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. A. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, F. Weinhold, NBO, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, **2001**, Version 5.0
- (15) PQS, Parallel Quantum Solutions, version 4.0, Green Acres Road, Fayetteville, Arkansas **2013**. 72703, <http://www.pqs-chem.com>.
- (16) P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793.
- (17) N. Sablom, F. De Proft. Computing Fukui functions without differentiating with respect to electron number. II. Calculation of condensed molecular Fukui functions. *J. Chem. Phys.* **2007** *126*, 224108.
- (18) J. L. Borioni, M. Puiatti, D. M. A. Vera, A. B. Pierini. In search of the best DFT functional for dealing with organic anionic species. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**. *19*, 9189-9198.
- (19) G. Scalmani, M. J. Frisch. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 114110–114115.
- (20) H. P. Hratchian and H. B. Schlegel, in *Theory and Applications of Computational Chemistry: The First 40 Years*, Ed. C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Kim, and G. Scuseria. *Elsevier, Amsterdam*. **2005**, 195-249.
- (21) J. B. Foresman and Æ. Frisch, *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 2nd ed. (Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1996**).
- (22) C. Peng, P. Y. Ayala, H. B. Schlegel, and M. J. Frisch, Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17* 49-56.
- (23) R. Krishnan, M. J. Frisch, J. A. Pople. Contribution of triple substitutions to the electron correlation energy in fourth order perturbation theory. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 4244–4245
- (24) J. Pople, M. Head-Gordon and K. Raghavachari. Quadratic configuration interaction. A general technique for determining electron correlation energies. *J. Chem. Phys.*, **1987** *87*, 5968
- (25) G. Scuseria, C. Janssen and H. Schaefer. An efficient reformulation of the closed-shell coupled cluster single and double excitation (CCSD) equations. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 7382.
- (26) I. Malvacio, E. L. Moyano, D. M. A. Vera. Gas-phase synthesis of 3-carboethoxy-quinolin-4-ones. A comprehensive computational mechanistic study to uncover the dark side of the Gould–Jacobs reaction. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 83973–88981.
- (27) J. P. Colomer, M.-L. Sciú, C. L. Ramirez, D.M.A. Vera, E. L. Moyano. Thermal Ring-Opening of Pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazin-4-ones: An Experimental and Theoretical Study. *European Journal of Organic Chemistry*. **2018** (13), 1514–1524.
- (28) W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. VMD - visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33-38.
- (29) G. E. Jara, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba, **2012**.

- (30) G. E. Jara, D. M. A. Vera, A. B. Pierini. Binding of Modulators to Mouse and Human Multidrug Resistance P-glycoprotein. A Computational Study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2013**, *46*, 10–21.
- (31) D. Globisch, Münzel M, Müller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M, Carell T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*. **2010**; *5*:e15367.
- (32) T. P. Miller, Grogan, T. M., Dalton, W. S., Spier, C. M., Scheper, R. J., & Salmon, S. E. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *Journal of Clinical Oncology*. **1991**, *9*, 17–24.
- (33) C. Globisch, I.K. Pajeva, M. Wiese. Structure-activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators., *Bioorg. Med. Chem*. **2006**, *14*, 1588–1598.
- (34) <https://www.eyesopen.com/rocs>, Venhorst *et al.*, **2008**.
- (35) J. J. P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods. V. Modification of NDDO approximations and application to 70 elements, *J. Mol. Model.*, **2007**, *13*, 1173-213.
- (36) T. Yanai, D. P. Tew, N. C. Handy. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett*. **2004**, *393*, 51–57.
- (37) G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell *et al.*, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem*. **2009**, *16*, 2785–2791.
- (38) W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph*. **1996**, *14*, 33–38.
- (39) M. L. González, D. M. A. Vera, L. Laiolo, M. B. Joray, M. Maccioni, S. M. Palacios, P. A. Lanza, S. Gancedo, V. Rumjanek, M. C. Carpinella. Mechanism underlying the reversal of drug resistance in P-glycoprotein-expressing leukemia cells by pinoresinol and the study of a derivative. *Frontiers in Pharmacology*. **2017**, *8*, 205.
- (40) Referencia 39 y bibliografía allí citada.
- (41) J. Laiolo, T. Tomašič, D. M. A. Vera, M. L. González, P. A. Lanza, S. N. Gancedo, Ž. Hodnik, L. P. Mašič, D. Kikelj, M.-C. Carpinella. Analogs of the lignan pinoresinol as novel P-glycoprotein (P-gp) inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2018**, En Prensa: ml-2018-00324t
- (42) R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, R.C. Walker. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput. Mol. Sci*. **2013**, *3*, 198-210.
- (43) A. W. Goetz, M. J. Williamson, D. Xu, D. Poole, S. Le Grand, R. C. Walker. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. *J. Chem. Theory Comput*. **2012**, *8*, 1542-1555.
- (44) W. Yau, W. Wimley, K. Gawrisch. The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 14713-14718.

- (45) J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, C. Simmerling. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696-3713.
- (46) C. J. Dickson, B. D. Madej, Å. A. Skjevik, R. M. Betz, K. Teigen, I. R. Gould, R. C. Walker. Lipid14: the amber lipid force field. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 865–879.

Parte I

Diseño, Síntesis Y Fotofísica De Sistemas Donor-Aceptor Unidos Por Base De Tröger

Capítulo 3. Modelado de la fotofísica de díadas basadas en derivados de bases de Tröger

Las celdas solares sensibilizadas por colorante tienen el *setup* de un colorante orgánico que actúa de antena, unido a un semiconductor o nanopartícula. La molécula antena es un colorante *pull-push*, es decir, contiene un centro donador (D) y otro aceptor (A) conectados a través de un sistema π conjugado (D- π -A). Cuando esta molécula es fotoexcitada se debería generar una separación de carga en el singlete más bajo (S_1) o bien en el singlete relajado (S_1^*), la cual es aprovechada para almacenar electrones en el semiconductor. La eficiente separación de carga en S_1 o S_1^* es el primer requerimiento para tener una DSSC funcional, además de muchos otros factores que pueden mejorar o deteriorar la eficiencia de la celda. Por ejemplo, la recombinación de la carga (BET, *back electron transfer*,) es uno de los fenómenos que se desea evitar en virtud de las propiedades de transporte selectivo de cargas del puente Tröger (Cap. 1, Secc. 1.2, Fig. 1.1).^{1,2}

Pocos años atrás, un tipo de puente tipo base de Tröger ($-\sigma_T-$, puente metanodibenzo[b,f][1,5]diazocina), un heterociclo tensionado con peculiares características en sus orbitales de frontera,² fue propuesto como puente eficiente pero a la vez selectivo, capaz de mediar la separación de carga y ofrecer ventajas (entre ellas para evitar la recombinación) sobre el *setup* convencional D- π -A. Este novedoso tipo de díada, cuyo esquema se muestra en la Figura 3.1, con el nuevo paradigma de puente selectivo alifático se estudió mediante modelado molecular a fin de obtener una descripción detallada de las propiedades sus estados de separación de carga y buscar racionalmente sus propiedades redox, estructurales y fotofísicas deseadas. Por otra parte, tenemos el interés básico de entender la fotofísica de estos sistemas Tröger asimétricos, hasta ahora inexploradas, a pesar de las interesantes propiedades encontradas en sus parientes simétricos.³ El estudio interdisciplinario involucró el trabajo en equipo con los grupos del Director (UNMdP), de síntesis (UNC) y de fotofísica del Co-director (UNRC).

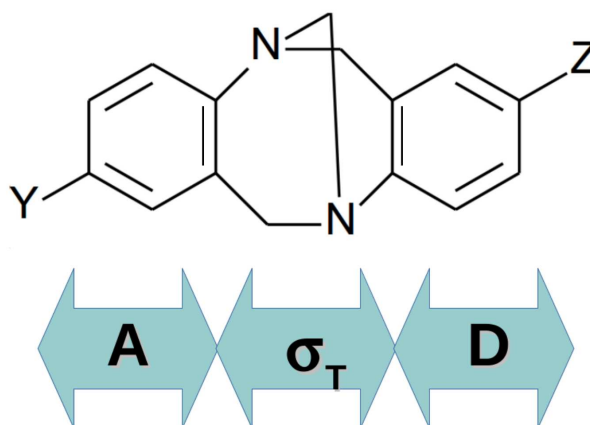


Figura 3.1. Esquema mínimo de una díada con puente sigma Tröger, D- σ_T -T. Como sistemas más sencillos el esqueleto aceptor, A, será un fenilo con grupo aceptor de e^- Y y el donador, D, con un grupo dador de e^- Z

3.1 Validación de los protocolos de cálculo empleando sistemas D- σ -A alifáticos 'convencionales' y D- π -A conjugados conocidos

Lejos de la precisión esperable de los funcionales híbridos y meta-GGA para estados fundamentales, el cálculo de estados excitados con la teoría de TDDFT es aún un desafío, particularmente para estados excitados con carácter de transferencia de carga (CT).⁴ Aunque se sabe que los funcionales más comunes tienen desviaciones importantes para algunos de estos sistemas, especialmente los de gran tamaño, no está del todo claro que los funcionales de rango corregido o rango separado como los LC y en particular CAM-B3LYP describan bien *cualquier* estado de CT, como proponen algunos autores.⁸ Por otra parte, los sistemas de mayor separación de carga suelen ser díadas o colorantes *pull-push* "convencionales", del tipo D- π -A, mientras que estos compuestos, al ser inéditos y también inexplorados para estas aplicaciones, carecían de referencia experimental. En el grupo se había logrado desentrañar con notable precisión las peculiaridades un colorante *pull-push* D- π -A, *a priori* "convencional", utilizando el tradicional B3LYP, en tanto que se obtuvieron resultados de calidad algo menor (cierta desviación al azul) con el CAM-B3LYP.⁵ También llamativamente, mientras que el grupo logró una descripción desprovista de efectos de sub- o sobredeslocalización de carga con CAM-B3LYP, con otros funcionales corregidos se vieron anomalías en sentido contrario; en particular ω B97-XD y LC-PBE localizaron la carga positiva de un sistemas de intervalencia que se sabía por numerosos experimentos propios y de bibliografía que eran deslocalizados (la bencidina, por ejemplo).^{2,6} A

fin de tener herramientas confiables para evaluar una variedad de díadas y predecir sus propiedades fotofísicas, para que luego fueran sintetizadas, se obtuvieron los espectros simulados de un set de díadas “convencionales” D- π -A. Estas especies, caracterizadas experimentalmente en bibliografía, se calcularon empleando TDDFT a fin de encontrar el mejor funcional y modelo de solvatación para la predicción de los espectros de nuevos sistemas D- σ -A. En esta búsqueda se escogieron también moléculas separadas por puentes alifáticos tradicionales (puente sigma, D- σ -A), dado que nuestros sistemas presentarían, en principio, dificultades de ambos tipos. Las estructuras del set de prueba se muestra en la Figura 3.2.⁷

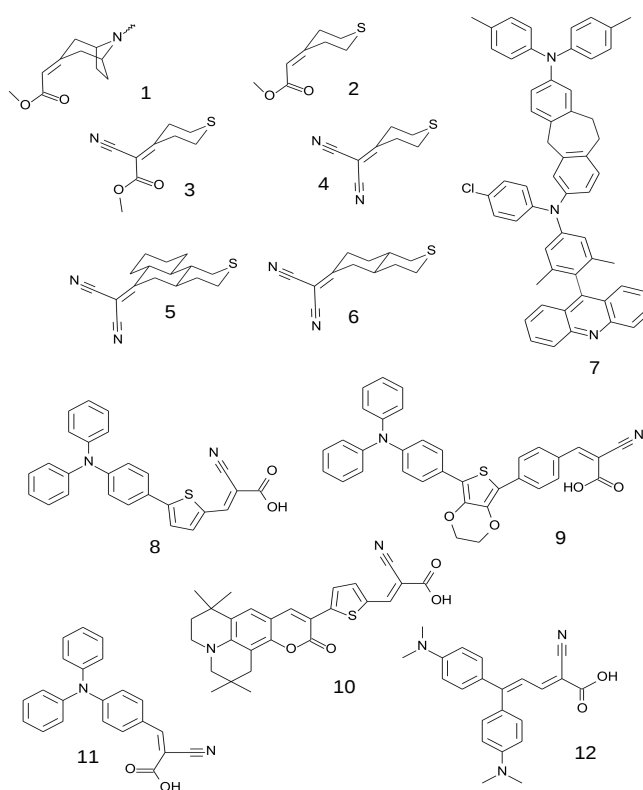


Figura 3.2 Conjunto de prueba incluyendo sistemas alifáticos D- σ -A 'convencionales' (díadas 1-7) y díadas típicas D- π -A (8-12).

Se testearon los funcionales CAM-B3LYP, M06-2X, ω B97-XD, B3LYP y PBE0. Los resultados se resumen en las Figuras 3.3 y 3.4, mostrando sólo el mejor, CAM-B3LYP, y el mejor de los no corregidos, PBE0. Se utilizaron las bases 6-31+G(d), teniendo en cuenta que se

necesitará explorar las superficies de varios estados excitados (caso de la emisión) de varias moléculas de tamaño relativamente grande. En algunos casos se hicieron pruebas con bases 6-311+G(d,p) sin obtener resultados sustancialmente mejores.

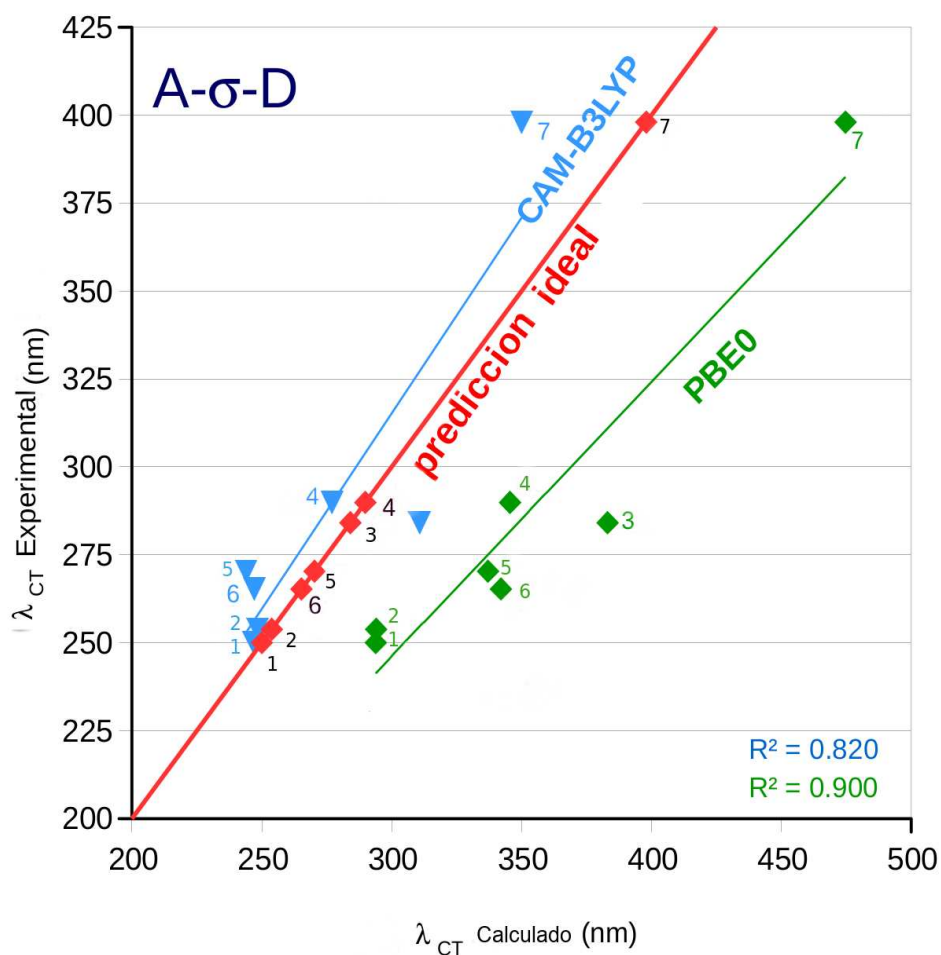


Figura 3.3 Correlaciones obtenidas con el mejor funcional range-corrected (CAM-B3LYP) y uno de los mejores no-correctados (PBE0) entre los que fueron testados. Los valores corresponden a la banda de absorción de menor energía calculada vs experimental: díadas alifáticas 1 a 7.

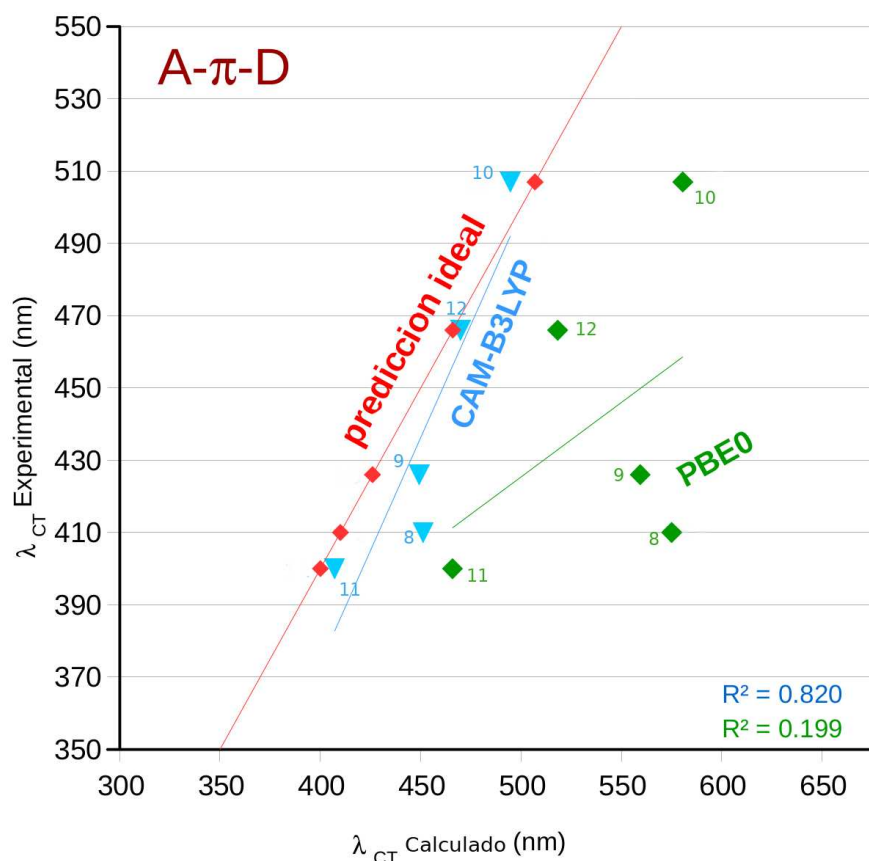


Figura 3.4: Correlaciones obtenidas con el mejor funcional range-corrected (CAM-B3LYP) y uno de los mejores no-correctados (PBE0) entre los que fueron testeados. Los valores corresponden a la banda de absorción de menor energía calculada vs experimental: díadas D- π -A 8 a 12.

El funcional CAM-B3LYP arrojó la mejor predicción a las bandas de absorción experimental seguido de M06-2X, PBE0 y B3LYP, los funcionales no corregidos se desplazaron marcadamente al rojo con respecto a los experimentos. Si bien es sabido que los funcionales no corregidos (a diferencia de los “range separated”, como CAM-B3LYP) suelen dar fuertes corrimientos al rojo en estados de transferencia de carga (CT) cuando la transferencia es de largo alcance,⁸ no está del todo claro el comportamiento en las díadas con puente Tröger, dadas las peculiaridades del sistema y la ausencia de abundantes (y recientes) datos computacionales sobre CT en sistemas alifáticos, lo que motiva a continuar el estudio empleando el funcional con las mejores correlaciones.

3.2 Prueba de principios para evaluar separación de carga en sistemas D- σ_T -A. Caracterización de los estados excitados.

Se evaluó preliminarmente la absorción empleando el modelo más rápido, respuesta lineal de equilibrio (LR),⁹ para un conjunto 20 díadas, que tuvieran una vía de síntesis plausible, a fin de seleccionar las más prometedoras para su síntesis (detalles en Información Suplementaria, Sección 3). Se buscó que el compuesto tuviera un estado de CT de baja energía, preferentemente el primer o segundo singlete (S_1 o S_2), puesto que en virtud de la regla de Kasha, una vez generados los estados verticales en la absorción S_1, \dots, S_n , todos ellos se relajan rápidamente a S_1^* , es decir a la geometría del estado excitado más bajo *relajado*.⁵ Este será el estado que emita por fluorescencia (o que se utilice para aprovechar la separación de carga en una DSSC funcional).ⁱ Lo importante es que S_1^* , cuya geometría puede diferir en mayor o menor medida de la de S_1 (en algunos casos podría correlacionar con S_2 , por ejemplo), sea en efecto un estado con fuerte grado de CT. El problema se describe esquemáticamente en la Figura 3.5.

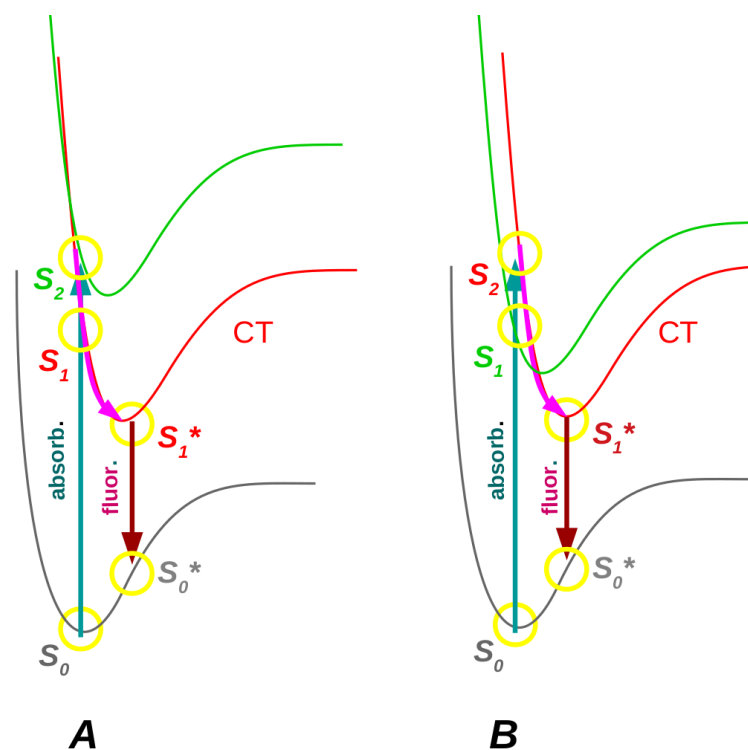
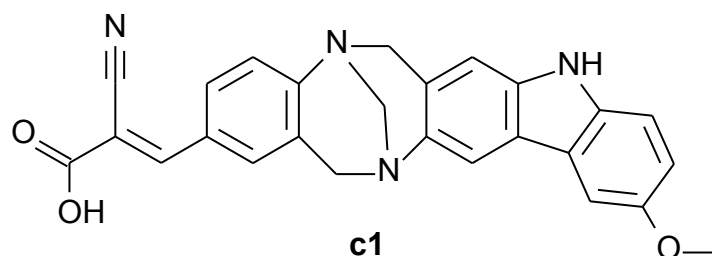


Figura 3.5. Representación esquemática de dos situaciones en las que el estado de CT es afín para los propósitos propuestos y al menos en principio, detectable por fluorescencia. A) El CT es el singlete más bajo o B) el CT es el más bajo al relajar (S_1^*).

i Naturalmente, en ausencia de procesos de relajación no radiativos y entrecruzamiento con algún triplete que lo desactive no radiativamente o por fosforescencia.

Computacionalmente, el costo es de al menos un orden de magnitud mayor para estudiar la fluorescencia que para la absorción, de ahí que se ha prestado atención no sólo al primer estado excitado S_1 de la absorción sino a un par de singletes más bajos que pueden relajarse a S_1^* . De esta manera, la inspección inicial solo se realizó teniendo en cuenta los cálculos de absorción, mientras que se calculaban los estados de absorción refinados (modelo SS)⁹ y se realizaban los estudios de emisión para sólo aquellas díadas que lograron sintetizarse. También se analizaron otros parámetros, como el grado de largo alcance, Λ , y el gap redox. Por último, aunque no es el objetivo en este primer intento de encontrar sistemas en realidad *prueba de principios*, sería que además el coeficiente de extinción (ϵ) de la absorción (o la fuerza del oscilador f en el cálculo) no sea extremadamente bajo y que además absorba en el visible, a λ relativamente bajas. De este set de compuestos uno de los más prometedores fue el compuesto rotulado como **c1**:



Este compuesto exhibió polarización total, de extremo a extremo, en su dos primeros singletes y un muy alto grado de separación de carga incluso hasta el 4to singlete, importantes absorciones de CT, comenzando desde 503 nm, con dipolos de 38.4 a 28.5 Debye en S_1 , S_2 , S_3 y S_4 (Figura 3.6).ⁱⁱ

ii $\Delta\mu$ del orden de 25 Debyes respecto del estado fundamental S_0

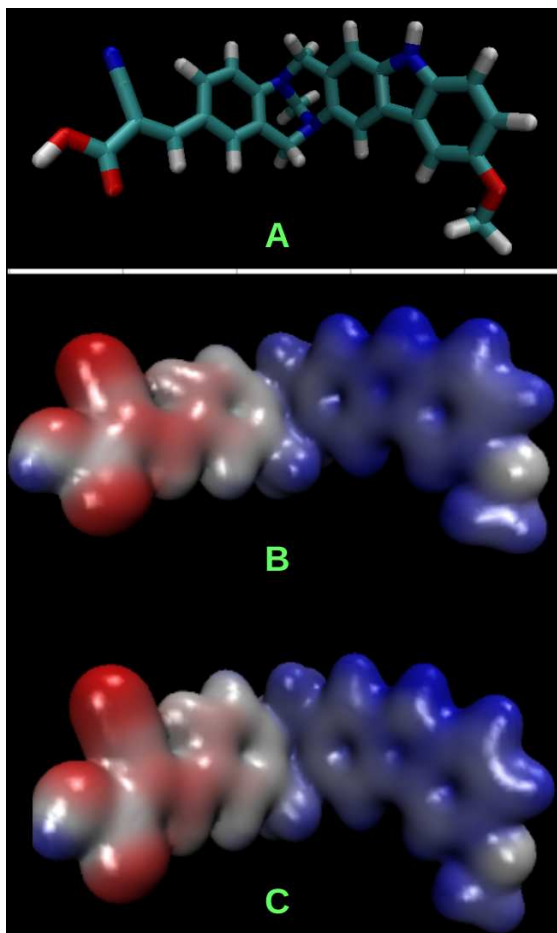


Figura 3.6. A) Estructura del compuesto **c1**. B-C). Potencial electrostático de los estados S_1 y S_2 , respectivamente. Coloreado de rojo (-0.2 u.a.) a azul (+0.2 u.a.) sobre una superficie de isodensidad electrónica de 0.02 e.

No obstante, la síntesis de **c1** no ha resultado posible en primera instancia y en realidad surgieron complicaciones experimentales para la síntesis de diferentes compuestos con base de Tröger, razón por la cual se decidió, sobre la marcha, encarar un estudio detallado de cada uno de los pasos del mecanismo de síntesis de estos compuestos. Estos resultados se mostrarán en el capítulo siguiente.

Del set de compuestos ensayados *in silico*, resultaron viables, sin embargo las síntesis de varios de ellos, y se eligieron 4 que resultaban prometedores, dentro de lo que era posible de sintetizar y 5 que según los cálculos sólo separarían carga parcialmente.ⁱⁱⁱ El set de compuestos que lograron sintetizarse, que tienen una diversidad representativa en lo referente a separación de carga se presentan en la Figura 3.7.

La díada mínima dentro de la serie de díadas propuestas, desde el punto de vista sintético, es **a1**, con un donador pobre (benceno). Para esta díada se encontró mediante los cálculos apenas una moderada separación de carga en el estado S_1^* , con un dipolo de 17-19 Debyes (variando según la polaridad del solvente). La transferencia de carga ocurre más bien entre el nitrógeno del CN- y el N cabeza de puente Tröger, que de punta a punta (Figura 3.8A). Los compuestos **a3** y **a4** presentan un mejor grupo donador (-OMe y -NMe₂, respectivamente) y mejoran algo el grado de CT en la absorción, aunque no llegan a ser transiciones 'de punta a punta', como se muestra en la Figura 3.8B.

iii Del compuesto **a5**, sólo fue posible sintetizar una pequeña cantidad por parte del grupo colaborador, por lo que sólo se estudió en absorción, no fue posible llevar a cabo los estudios completos de fluorescencia y solvatocromismo.

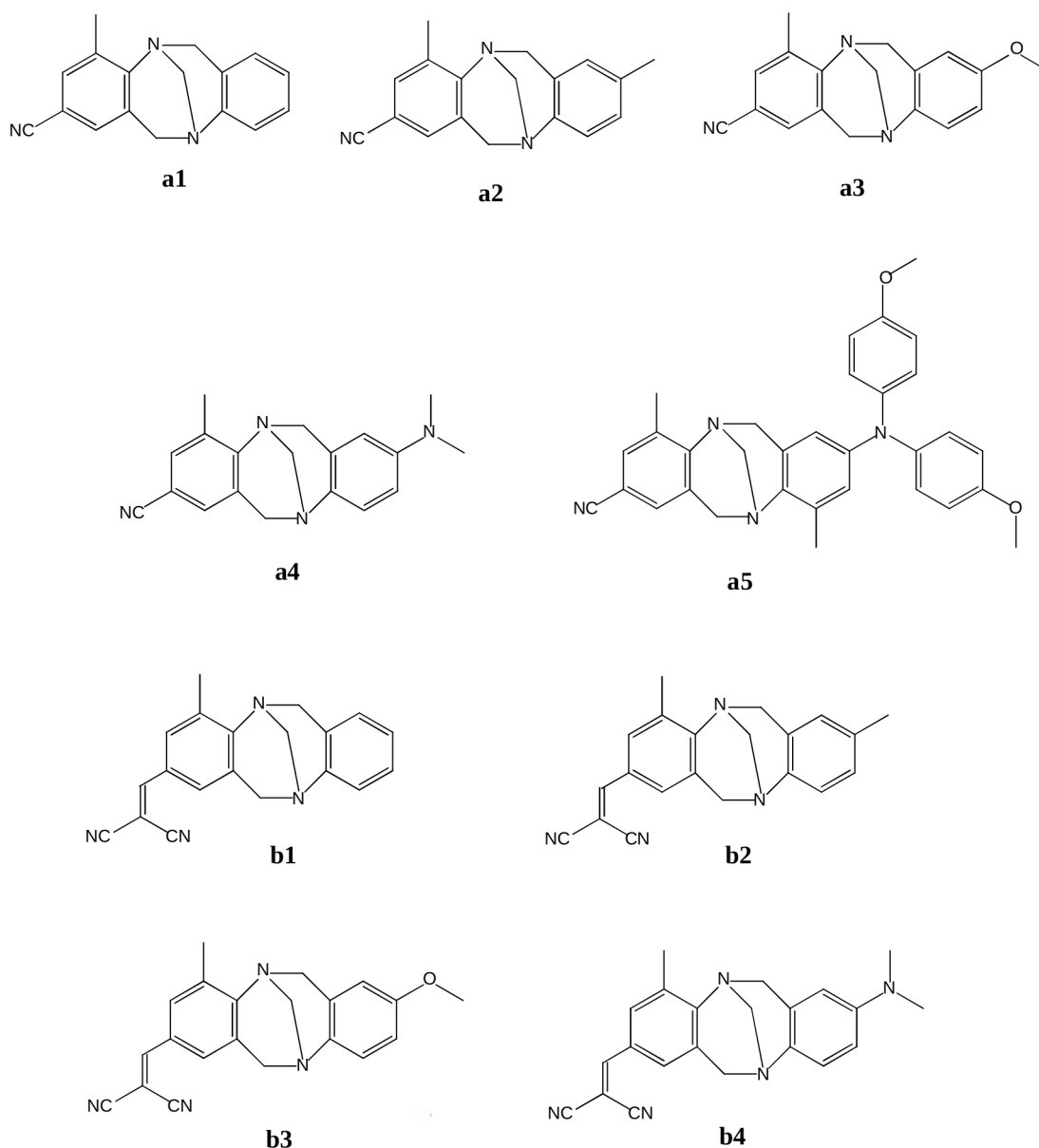


Figura 3.7. Conjunto de díadas tipo $D-\sigma_T-A$ sintetizadas por el grupo colaborador de la UNC y cuya fotofísica se caracterizó en la UNRC.

Al mejorar el grupo aceptor, ciano por dicianovinil, los compuestos **b1-b3** mejoran la separación de carga, y el estado más bajo en la absorción, S_1 , es plenamente CT de extremo a extremo para **b4**, como se muestra en la Figura 3.8C. El grado de separación de carga o carácter de CT se evaluó en virtud de las densidades de transición (Figura 3.8) como así también en los momentos dipolares, el parámetro Λ y sus potenciales electrostáticos moleculares (como en la Figura 3.6) o sus valores condensados sobre cada átomo, por medio de las cargas de Merz-

Kollman o cargas ESP.¹⁰ En el caso de **b1**, si bien el estado S_1 es CT desde el dicianovinil al puente Tröger, el segundo singlete excitado, S_2 está más próximo a S_1 y, por lo que es probable que cualquiera de ellos, S_1 o S_2 , termine siendo el S_1^* , una vez relajado, que es en definitiva donde se busca tener la separación de carga.

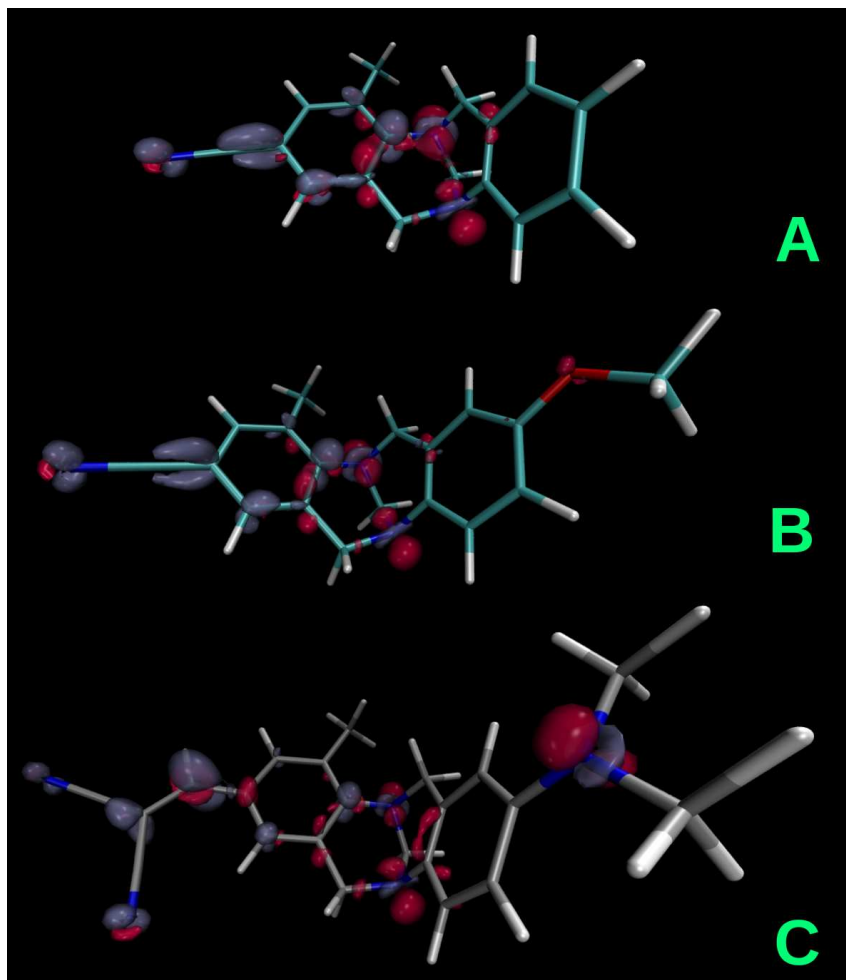


Figura 3.8. Densidades de transición $S_0 \rightarrow S_1$ para algunas de las díadas estudiadas. Superficies de isodensidad de 0.05 e, rojo=desde, azul=hacia. A) **a1** . B) **a3**. C) **b4**.

Estas características interesantes en la absorción serían ratificadas al aplicar la metodología específica para transiciones verticales (no equilibrio o SS,⁹ detalles en Capítulo 2) y reproducir el espectro completo, que involucra transiciones $S_0 \rightarrow S_1$ (que para algunos compuestos es muy débil) hasta $S_0 \rightarrow S_8$ o hasta dónde empieza a absorber la celda o el solvente ($\lambda \leq 260$ nm). Como se muestra en las Figuras 3.9-3.12, se logró en general un excelente acuerdo entre las transiciones experimentales y las predichas (indicadas como barras verticales, intensidades a partir de sus fuerzas de oscilador en escala arbitraria, véase también Tabla 3.1). Se midió el espectro de

absorción en los siguientes solventes, en orden ascendente de polaridad: n-hexano ($\epsilon=1.882$), dibutyleter ($\epsilon=3.0473$), acetato de etilo ($\epsilon=5.987$), diclorometano ($\epsilon=8.93$) y acetonitrilo ($\epsilon=35.688$). *In silico*, se simularon con el modelo SS⁹ el solvente de menor polaridad (n-hexano), polaridad intermedia (diclorometano) y mayor polaridad (acetonitrilo).

En la Tabla 3.1. se resumen las propiedades calculadas para los estados con algún grado de CT encontrados en los espectros experimentales para n-hexano y acetonitrilo.

Los momentos dipolares de los estados excitados de la tabla 3.1 y la exhaustiva inspección de las densidades de transición de cada uno de ellos (véase por ejemplo Figura 3.8) sugiere que en efecto algunas de las díadas sintetizadas son capaces de separar carga efectivamente. En la absorción se ven algunos momentos dipolares y transiciones interesantes como los compuestos **a4**, **b3** y **b4**, aunque más allá del buen acuerdo entre las longitudes de onda experimentales y calculadas, recién se puede tener una idea cabal de la separación de carga al probar el solvatocromismo observado en la fluorescencia. Es decir, asegurarnos que el singlete más bajo relajado, S_1^* , sea un estado con una separación de carga importante. A mayor polarización de S_1^* se observarán corrimientos al rojo más grande al aumentar la polaridad del solvente.

Tanto experimental como computacionalmente los compuestos con los donores más pobres tuvieron prácticamente el mismo comportamiento independiente de tener benceno (**a1** y **b1**) o tolueno (**a2** y **b2**) en el extremo donador, por lo tanto sólo se estudiaron **a1** y **b1**.

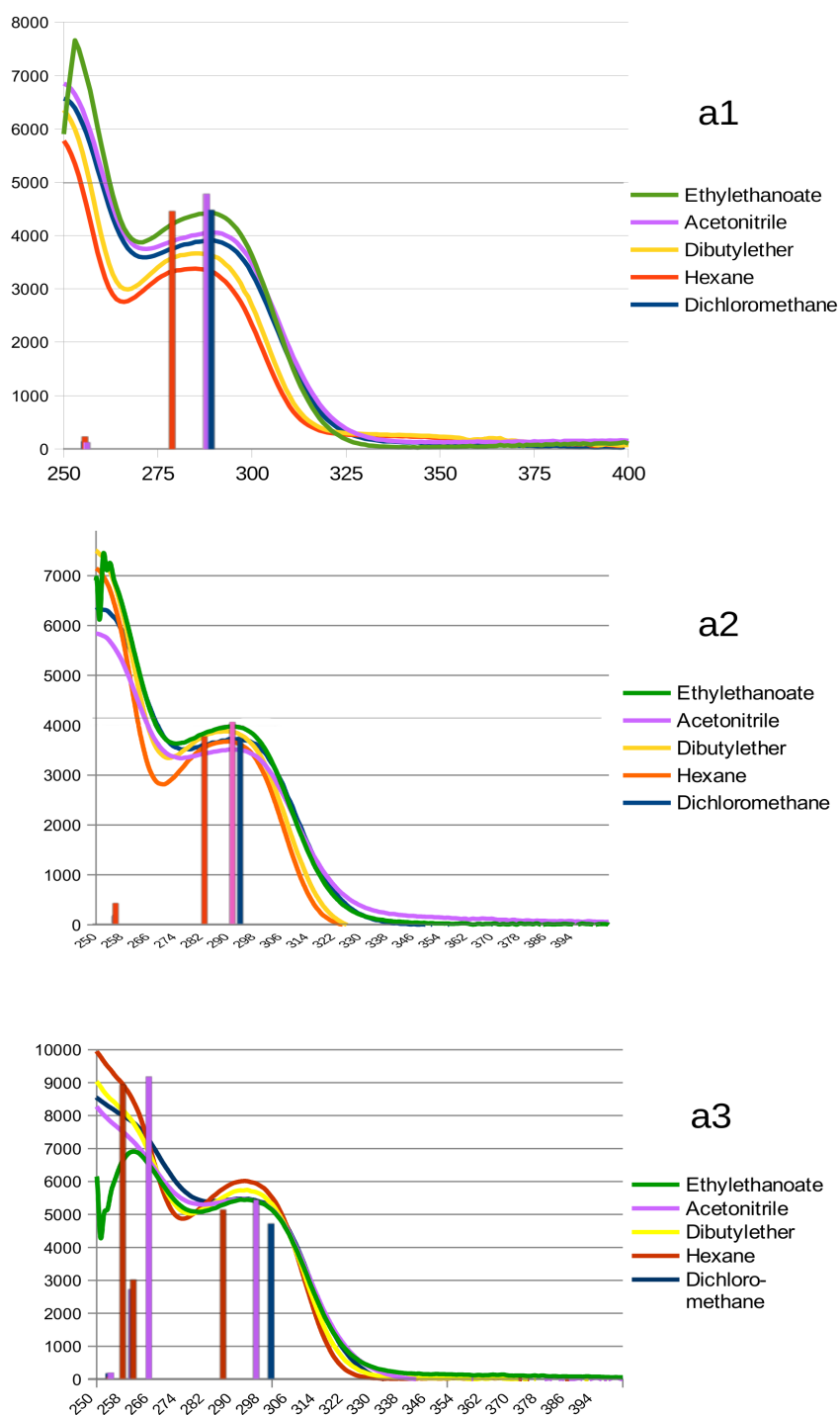


Figura 3.9. Espectros de absorción experimentales con la superposición de las bandas calculadas con el nivel de CAM-B3LYP/6-31+G* en el modelo SS; en longitudes de onda en λ / nm.

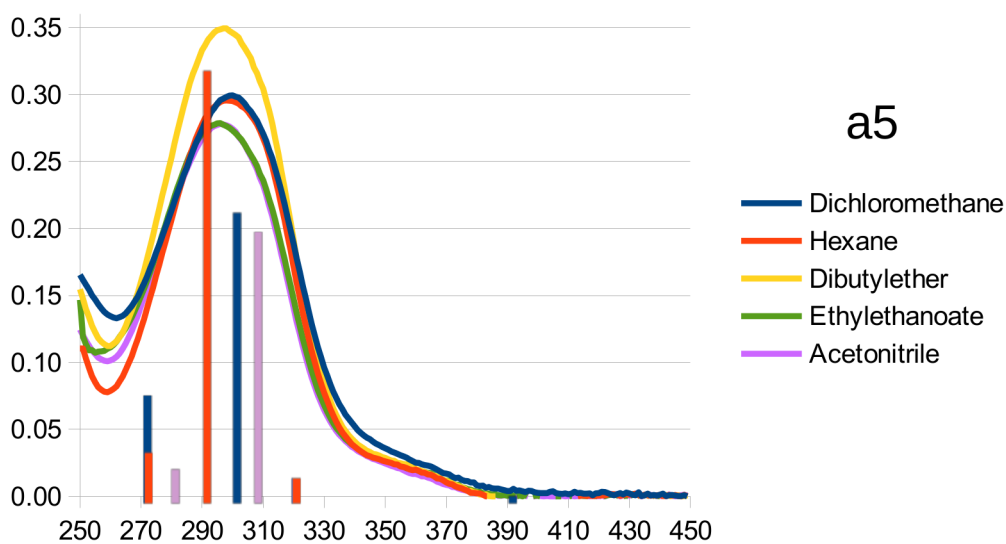
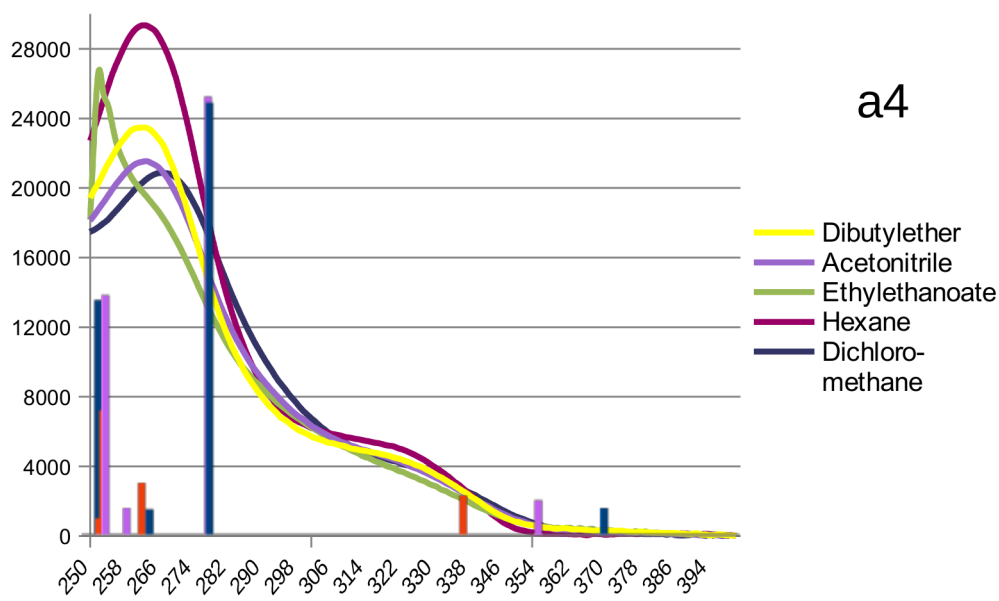


Figura 3.10 . Espectros de absorción experimentales con la posición de las bandas calculadas con el nivel de CAM-B3LYP/6-31+G* en el modelo SS; en longitudes de onda λ (/ nm). (Para a5 no se reporta ϵ sino intensidades relativas (no reducidas)).

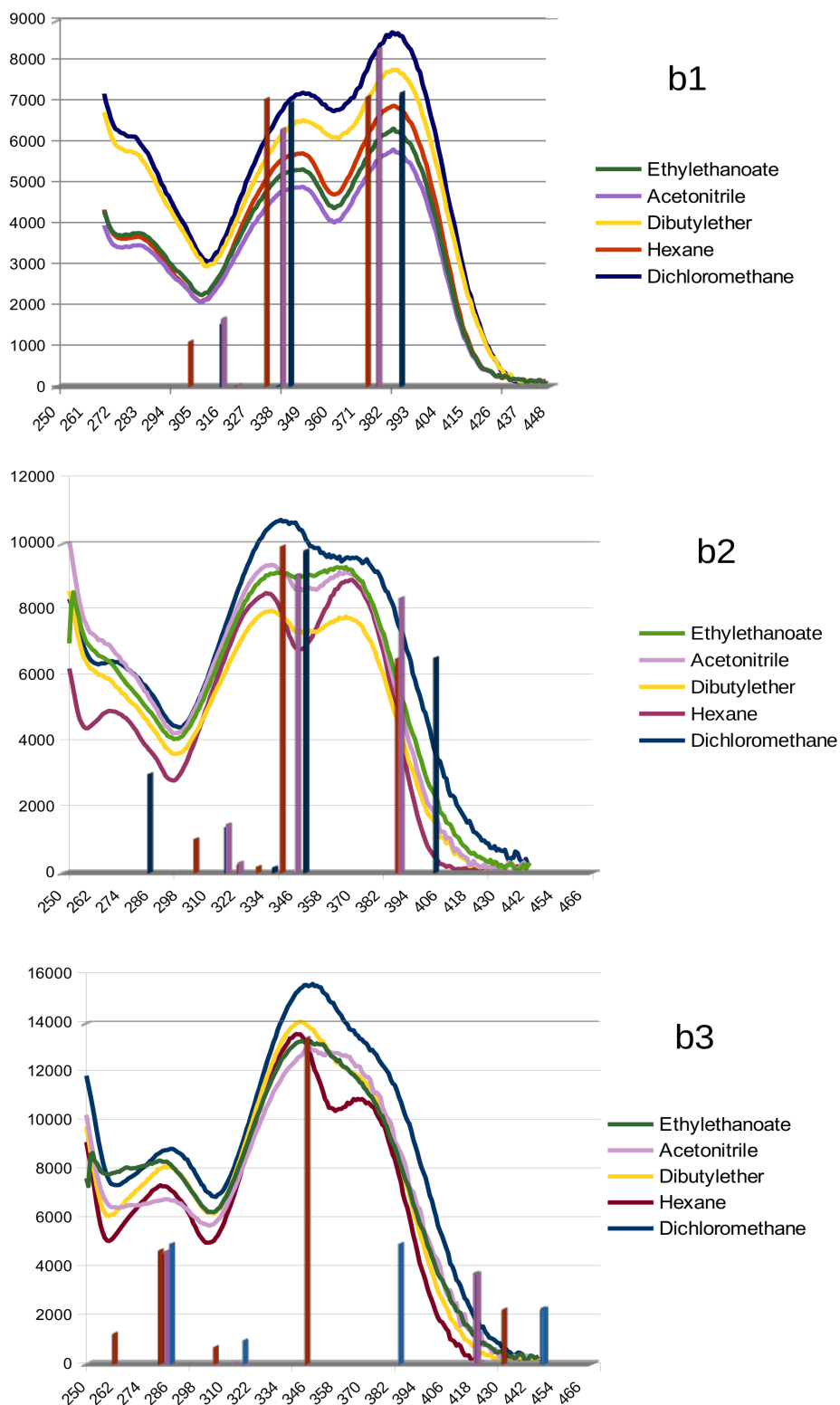


Figura 3.11. Espectros de absorción experimentales con la posición de las bandas calculadas con el nivel de CAM-B3LYP/6-31+G* SS. Longitudes de onda en λ /nm.

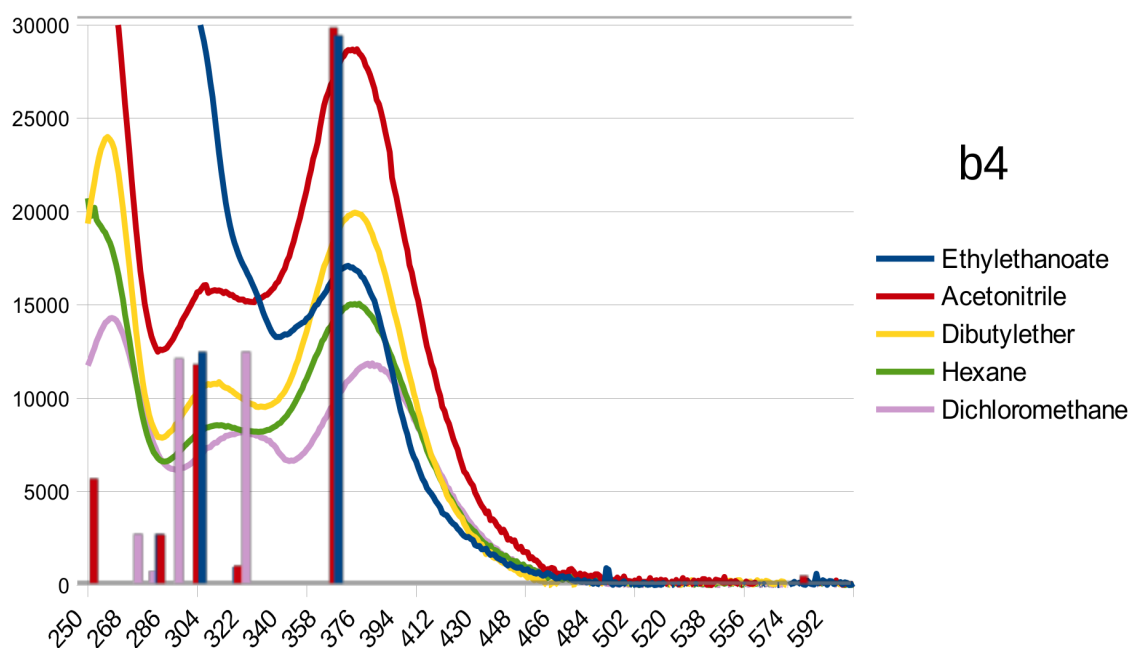


Figura 3.12. Espectros de absorción experimentales con la posición de las bandas calculadas con el nivel de CAM-B3LYP/6-31+G* en el modelo SS; en longitudes de onda λ (/ nm).

Tabla 3.1. Estados con algún grado de CT en n-hexano y acetonitrilo, calculados y experimentales.

díada	solvente	calculado, corrección de no equilibrio SS			experimental
		f	μ (/Debye)	λ abs. (/nm)	λ abs. (/nm)
n-hexano					
a1		0.143	15.05	278.7	285
a2		0.127	16.00	282.1	290
a3		0.099	17.41	287.0	292
a4		0.019	26.57	336.7	337
a5		0.026	8.40	315.5	298 ^(a)
b1		0.358	20.80	375.5	381
b2		0.261	22.97	389.2	385
b3		0.081	27.73	431.5	430
b4		0.658	21.05	334.0 ^(b)	375 ^(c)
acetonitrilo					
a1		0.153	15.89	287.8	289
a2		0.137	16.83	291.2	292
a3		0.105	18.35	295.8	294
a4		0.017	27.87	354.0	324
a5		0.025	9.44	314.3	296 ^(d)

b1	0.417	21.03	380.4	381
b2	0.335	22.76	389.6	379
b3	0.135	27.07	419.5	427
b4	0.008	36.66	582.1	540 (?) ^{e)}

a) y **d)** Se reporta el singlete más bajo, S_1 , aunque este no tiene ningún carácter de CT, recién se encuentran estados CT en los singletes más altos y no es posible asignarlos.

b) Se reporta S_2 , con cierto carácter de CT, pero S_1 tiene un f menor a 10^{-3} , por lo que se considera indetectable

c) Por deconvolución, el pico puede corresponder a dos transiciones.

e) El f calculado es muy bajo y la relación señal/ruido no permite asegurar su presencia, el próximo estado asignado S_2 también sería CT, $\mu = 30.31$ Debyes, $\lambda = 364.7$ calculada y 371 experimental.

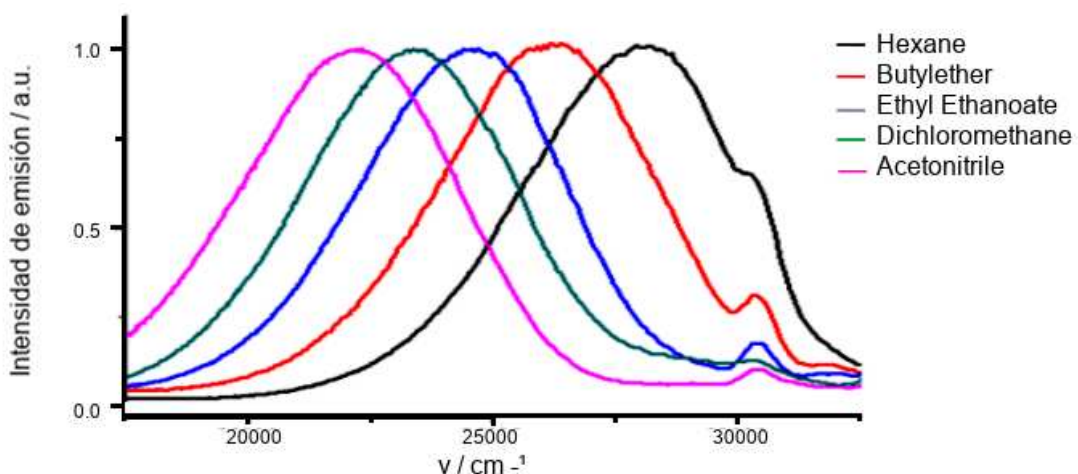


Figura 3.13 . Espectros de emisión con intensidad normalizada y graficados sobre números de onda en cm^{-1} . Solvatochromismo estudiado para la díada **a3**.

En la Tabla 3.2 se resumen los experimentos estudios de fluorescencia experimentales contrastados con los resultados calculados. Se ilustra el procedimiento para evaluar el solvatochromismo de emisión en la Figura 3.13, mostrando los espectros de fluorescencia experimentales obtenidos en la UNRC para el caso del compuesto **a3**.

Tabla 3.2. Síntesis de resultados de la fotofísica de fluorescencia, calculados y experimentales en los solventes seleccionados.

solvente ^(a)	λ_f exp.	λ_f calc.	$\Delta \lambda$ exp. ^(b)	$\Delta \lambda$ calc. ^(b)	$\mu/(S_1^*)$ Debye	$\mu/(S_0^*)$ Debye	$\Delta\mu^{(c)}$ Debye	f	$\Phi_f^{(d)}$	τ_f /ns ^(e)
a1										
HEX	368.0	407.9			14.13	5.49	8.64	0.38	0.033	1.6
			51.0	64.8						
DCM	419.0	472.7			16.9	5.49	11.41	0.11	0.055	3.3
			15.0	14.0						
ACN	434.0	486.7			17.74	6.76	10.98	0.04	0.042	1.2
a3										
HEX	364.0	408.1			15.28	6.39	8.89	0.02	0.013	0.5
			67.0	66.8						
DCM	431.0	474.9			18.86	8.27	10.59	0.025	0.012	1.7
			18.0	32.2						
ACN	449.0	507.1			20	9.17	10.83	0.02	0.011	3.0
a4										
HEX	378.0	450.1			24.31	6.49	17.82	0.01	0.009	0.4
			125.0	168.9						
DCM	503.0	619.0			28.58	7.41	21.17	0.01	0.007	0.6
b1										
HEX	439.0	431.0			21.33	10.19	11.14	0.35	0.023	0.1
			145.0	142.0						
DCM	584.0	573.0			27.49	12.37	15.12	0.19	0.002	0.4
b3										
HEX	471.0	446.0			28.4	8.46	19.94	0.04	0.003	1.7
			133.0	124.0						
AE ^(g)	604.0	570.0			32.76	11.45	21.31	0.04	< 10 ⁻⁴	0.0
b4										
HEX	554.6	526 ^(g)	-	-	31.7	9.85	21.85	0.008	0.001	0.5

a) HEX=n-hexano, AE=acetato de etilo, DCM=diclorometano, ACN=acetonitrilo.

b) Corrimiento (al rojo) entre un solvente y el próximo más polar.

c) Cambio de momento dipolar entre $S_1^* \rightarrow S_0^*$

d) Rendimiento cuántico observado de fluorescencia.

e) Tiempo de vida media de fluorescencia.

f) Solvente más polar donde aún fluorescía con un rendimiento apreciable. No se midió en DCM ni en ACN.

g) No convergió la corrección de SS, se reporta el valor aproximado (valor con modelo LR).

Tal como se había previsto en la inspección preliminar del set completo de díadas *in silico*, **a1** (y por inducción **a2**) y **a3** sólo separan carga parcialmente, siendo la transición $S_1^* \rightarrow S_0^*$ (al igual que en la absorción, $S_0 \rightarrow S_1$) "a mitad de camino", es decir el nitrógeno del puente Tröger, actúa como donador y no el extremo -Ph o -Ph-CH₃ o -Ph-O-CH₃ (Figura 3.8B). Esto se refleja tanto en las densidades de transición, como en sus momentos dipolares y los corrimientos $\Delta\lambda_f$ menores en comparación a las transiciones para las díadas "de punta a punta". Compárese, por ejemplo (Tabla 3.2) desde n-hexano a diclorometano: los 51 nm (experimental, calculado: 64.8 nm) para **a1** y los 66 nm (experimental, calculado: 66.8 nm) para **a3** contra los más de 125 nm de las que se tuvieron mayores momentos dipolares, **a4**, **b1** y **b3**. El caso de **a4** fue claro desde los estudios de absorción, donde su S_1 ya era visiblemente más polarizado que sus análogos **a1-a3**. Esto se atribuye al mejor grupo donador -NMe₂. Al mejorar la capacidad aceptora del otro extremo, cambiando el grupo ciano por el dicianovinil, todas las **b**- resultan más capaces de separar cargas que sus contrapartes **a**-. En la próxima sección intentaremos obtener una valoración más exacta y rigurosa de qué tan buenos donores o aceptores permiten la máxima separación de carga.

Los casos de **b1** y **b3** son interesantes, porque el estado excitado relajado S_1^* (fluorescencia) tuvo un carácter de CT mucho mayor que el estado vertical, S_1 , revelando que al relajarse va al estado de mayor separación de carga (el estado que tenía mayor momento dipolar en la absorción era el S_2 , esquemáticamente el caso B en la Figura 3.5). En la Figura 3.14 se muestra la densidad de transición para el estado de CT de **b3**, polarizado con un μ de 32.7 Debye.

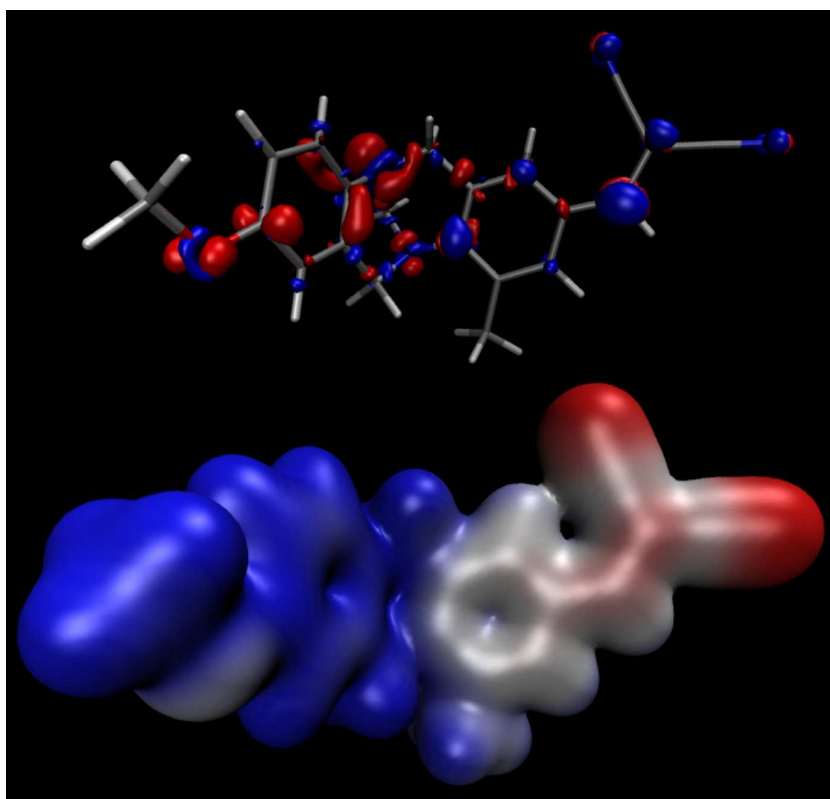


Figura 3.14. Densidad de transición desde S_1^* (arriba) y potencial electrostático [abajo, rojo (-), azul (+)] para **a3**. Escala como en la Figura 3.8.

El caso de **b4** es particular, porque su rendimiento cuántico y su tiempos de vida fueron muy bajos, sobre todo en los solventes polares, pudiéndose obtener su espectro de fluorescencia sólo en n-hexano, con un tiempo de de apenas 0.5 ns. Esto ilustra la complejidad del diseño de especies de CT en sí, puesto que la relajación por vías no radiativas no es directamente estimable a partir del estudio de TDDFT. Por otra parte, una peculiaridad de **b4** fue que al explorar la superficie de energía potencial de S_1 , se encontró otro mínimo S_1^{**} , próximo a S_1^* en energía (0.5 eV), donde el nitrógeno -planar en S_1^* - se piramidalizaba y el NMe_2 rotaba poniéndose oblicuo respecto del plano del fenilo (23 grados). Esta estructura es similar al triplete T_1 , también próximo en energía (comparación de las estructuras y caracterización en la Información Suplementaria). La isomería orbital en compuestos N,N -dimetilamino-areno ya fue observada en el estudio de los estados excitados de otro *pull-push*¹¹ y no tiene relación directa con el puente Tröger, sino con el esqueleto N,N -dimetilaminoaril-. El estado de CT de **a4**, también con sustituyente NMe_2 , se encontró a energías mayores (al azul) respecto de **b4** y posiblemente más alejado en energía de estas especies; nótese que la energía del CT no depende sólo de un extremo (N,N -dimetilaril o lo

que actúe como donador de la díada) sino de la diferencia de energías entre los centros donador y aceptor. También podría haber otras vías no radiativas que no involucren a T_1 , más allá de que la fuerza del oscilador muy baja calculada ya permitía sospechar rendimientos de fluorescencia bajos.

Como se encontró a nivel de diseño *in silico* y se comprobó experimentalmente, las díadas con donores y/o aceptores "no tan buenos" no darían una separación de carga importante. De hecho, **a1**, **a2** y **a3** sí son colorantes *pull-push* y sí separan cargas, pero el donador es el puente en sí mismo y no el extremo de la díada. Por lo tanto resultó interesante cuantificar el gap redox entre donador y aceptor a fin de determinar qué tan baja es la energía (es decir qué tan es el conjunto donador y aceptor cuantitativamente) para esperar una separación de carga entre los extremos de la díada.

3.2.1 Separación de carga en sistemas D- σ T-A y cálculo del gap redox Donor/Aceptor

Con la formulación UCAM-B3LYP se calcularon las especies semioxidadas y semireducidas para calcular el gap redox. Se demostró que ésta es una aproximación claramente mejor que el simple gap HOMO/LUMO, al obviar problemas del LUMO de Kohm-Sham y tener en cuenta la solvatación y otros factores (Cap. 2, secc. 2.2.3).¹² Los valores obtenidos para las díadas sintetizadas se resumen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Gap Redox calculado para una serie de díadas con grupo dador ciano y dicianovinil.^(a)

Díada	Y	Z	gap (eV)
a1	CN-	-H	4.10
a2	CN-	-Me	4.06
a3	CN-	-OMe	3.91
a4	CN-	-NMe2	3.53
b1	dicianovinyl-	-H	2.95
b2	dicianovinyl-	-Me	2.91
b3	dicianovinyl-	-OMe	2.66
b4	dicianovinyl-	-NMe2	2.09

a) Y y Z son los sustituyentes en el fragmento aceptor y donador, respectivamente, de acuerdo al esquema general de la Figura 3.1.

Los valores de gap redox menor poseen mejores características como dupla dador-aceptor para la transferencia de carga intramolecular y darán estados de CT de más baja energía (más al rojo). Al menos a partir de **a4** o a partir 3.5 eV se logra una separación de carga importante en base a los análisis de las densidades de transición, cargas, dipolos y solvatocromismo experimental (en los casos que fue posible medirlo). Afortunadamente, entre la serie de díadas (Información Suplementaria) propuesta como candidatos para su síntesis, hay 12 compuestos que están entre 1.90 y 2.94 eV. Estos cálculos, probadamente precisos en química redox,^{2 12} resultan interesantes como filtro rápido (o primer requisito) para pensar en nuevas díadas, teniendo en cuenta el menor costo computacional de los cálculos involucrando estados fundamentales respecto a los de TDDFT.

3.2.2 Evaluación de la extensión de CT (Λ) en díadas A- σ_T -D y A- π -D

La extensión o característica de "largo alcance" del estado CT se caracterizó por el parámetro Λ (Capítulo 2, Sección 2.2.1) Típicamente, para una transición local, Λ se encuentra por encima de 0.7. Para una CT entre centros lejanos, aunque eficientemente conectados, Λ se encuentra entre 0.10 y 0.65. Y para un mal acoplamiento debido a la simetría orbital o bien a una distancia extremadamente grande, por debajo de ~ 0.15 .¹³

Tabla 3.4. Factor de acoplamiento Λ de los estados excitados S_1 de algunos de los compuestos calculados con estructura Donor – puente – Aceptor

Compuesto	Λ
a3	0.47
b4	0.15
7	0.26
8	0.63
9	0.58

En la Tabla 3.4 se comparan los valores de Λ obtenidos para dos de las díadas sintetizadas y estudiadas, **a3** y **b4**, con tres díadas típicas, del tipo D- π -A, los compuestos **6**, **7** y **8** (Figura 3.3). Independientemente de los análisis anteriores, los estados S_1 de estos compuestos estarían en el

rango esperado para transiciones de CT, y comparables con sistemas empleados en celdas funcionales.⁷

3.3 Conclusiones

Se llevó a cabo un estudio teórico-experimental de la fotoquímica y la fotofísica de sistemas donador-aceptor puenteados por bases de Tröger, caracterizando los estados excitados de CT de estos compuestos, hasta donde sabemos, no exploradas hasta el momento. Se lograron separaciones de cargas importantes comparables a las observadas en sistemas conjugados, tal como lo demuestra el solvatochromismo, de un sistema alifático; un hecho en sí mismo notablemente inusual.

Al menos tres de las díadas que lograron sintetizarse y caracterizarse en su fotofísica, **a4**, **b1** y **b3** cumplen el objetivo de funcionar como sistema prueba de principios para un colorante *pull-push* o antena de una DSSC basado en un diseño diferente al paradigma D- π -A conocido hasta el momento. Además de las propiedades de transporte de carga, existen otras ventajas que podrán explorarse en el futuro, por ejemplo, la forma de "V" y la rigidez de estos sistemas, una característica que *a priori* permite esperar que disminuya también el problema del π - π *stacking*, que promueve el *hopping* entre díadas totalmente planas y largas como las que se basan en el diseño D- π -A.

El buen acuerdo entre las propiedades calculadas y experimentalmente medidas validaron un protocolo de trabajo interdisciplinario, que permitirá en el futuro sintetizar nuevas moléculas con propiedades deseadas no sólo en el marco de díadas aplicables a DSSCs, sino también para otras aplicaciones relacionadas con las singulares propiedades electrónicas de estos sistemas.

- (1) Véase Capítulo 1, sección 1.2 y referencias allí citadas.
- (2) C. L. Ramírez, R. Procaccini, C. A. Chesta, A. R. Parise, D. M. A. Vera. Selective charge transfer in donor/acceptor systems bridged by Tröger base derivatives. *Organic Electronics*, **2013**, *14* 2564-2572.
- (3) C. L. Ramírez, L. Trupp, A. Bruttomesso, V. T. Amorebieta, D. M. A. Vera, A. R. Parise. Charge transfer properties of Troger base derivatives, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 20076-20080
- (4) C. Adamo, D Jacquemin. The calculations of excited-state properties with Time-Dependent Density Functional Theory. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 845–856.
- (5) a) G. E. Jara, N. Solís, C. A. Glusko, C. M. Previtali, A. B. Pierini, C. A. Chesta, H. A. Montejano, D. M. A. Vera. "On the Electronic Transitions of the Methylene Violet Dye in Aprotic Solvents. A Theoretical and Experimental Study", *Dyes and Pigments.*, **2015**, *112*, 341-351. b) G. E. Jara, **2012**, Estudio Computacional de Procesos de Interés Orgánico y Biológico. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.
- (6) P.J . Low, M. A. J. Paterson, A. E. Goeta, D. S. Yufit, J. A. K. Howard, J. C. Cherryman, D. R. Tackley, B. Brown, The molecular structures and electrochemical response of “twisted” tetra(aryl)benzidenes. *J. Mater. Chem.* **2004**,*14* ,2516–2523
- (7) a) Oevering, H., Paddon-Row, M. N., Heppener, M., Oliver, A. M., Cotsaris, E., Verhoeven, J. W., & Hush, N. S. Long-Range Photoinduced Through-Bond Electron Transfer and Radiative Recombination via Rigid Nonconjugated Bridges: Distance and Solvent Dependence. *Journal of the American Chemical Society*, **1987** *109*, 3258–3269.; b) Oevering, H., Verhoeven, J. W., Paddon-Row, M. N., & Warman, J. M. Charge-transfer absorption and emission resulting from long-range through-bond interaction; exploring the relation between electronic coupling and electron-transfer in bridged donor-acceptor systems. *Tetrahedron*, **1989**. *45*, 4751–4766. c) Verhoeven, J. W., & Pasman, P. The relative sign of through-bond and through-space interactions; “sigma assistance” of cyclization and intramolecular hydrogen transfer. *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 943–947. d) Holzapfel, M., & Lambert, C. Photoinduced Charge Separation and Recombination in Acridine–Triarylamine-Based Redox Cascades. *The Journal of Physical Chemistry C*, **2008**. *112*, 1227–1243. e) Wang, Z.-S., Hara, K., Dan-oh Yasufumi, Kasada, C., Shinpo, A., Suga, S., ... Sugihara, H. . Photophysical and (Photo)electrochemical Properties of a Coumarin Dye. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2005**. *109*, 3907–3914. f) Hara, K., Wang, Z.-S., Sato, T., Furube, A., Katoh, R., Sugihara, H. Suga, S. Oligothiophene-Containing Coumarin Dyes for Efficient Dye-Sensitized Solar Cells. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2005**, *109*, 15476–15482.
- (8) M. J. C. Peach, P. Benfield, T. Helgaker, D. J. Tozer, *Excitation energies in density functional theory: an evaluation and a diagnostic test. J. Phys. Chem.* **2007**, *128*, 044118.
- (9) R. Improta, V. Barone, G. Scalmani, M. J. Frisch, A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 05410.
- (10) B. H. Besler, K. M. Merz Jr., and P. A. Kollman, Atomic charges derived from semiempirical methods, *J. Comp. Chem.*, **1990**, *11*, 431-439
- (11) Véase, por ej. referencia 5a y bibliografía allí citada.

- (12) J. L. Borioni, M. Puiatti, D. M. A. Vera, A. B. Pierini. In search of the best DFT functional for dealing with organic anionic species. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2017**, *19*, 9189-9198.
- (13) M. J. G. Peach, P. Benfield, T. Helgaker, D. J. Tozer. Excitation energies in density functional theory: An evaluation and a diagnostic test. *The Journal of Chemical Physics.* **2008**, *128*, 044118.

Capítulo 4. Determinación del mecanismo de síntesis de díadas puenteadas por base de Tröger

Debido a las dificultades sintéticas que se presentaron para lograr una variedad de díadas como las descritas y motivados por el notable interés que revisten estas moléculas para otras diversas aplicaciones en Química supramolecular,¹ nanotecnología,²⁻¹¹ delivery de drogas, reconocimiento de biomoléculas y actividad biológica,³ síntesis asimétricas como auxiliares quirales⁴ y otras aplicaciones, se decide encarar el estudio del mecanismo que lleva a la síntesis de estos derivados partiendo de anilinas y formaldehído con catálisis ácida. Más allá del interés particular en estas y otras aplicaciones, no existe hasta donde sabemos una comprensión del mecanismo, además de algunas propuestas incompletas y contradictorias y la aparición en bibliografía de unos pocos intermediarios.

El estudio se llevó a cabo a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) en solvente IEPFCM (SCRF), explorando las superficies de energía potencial de todas las posibles vías de acoplamiento entre las anilinas sustituidas iniciales y adiciones de metileno (a partir de formaldehído) catalizadas por ácido (detalles en el Cap. 2 sección 2.2.5).

Se espera que el nivel de teoría utilizado sea satisfactorio, debido a que ya fue empleado por el grupo exitosamente para otros estudios de reacciones de condensación para síntesis de heterociclos complejos y se obtuvieron energías libres relativas comparables a las obtenidas a nivel MP4(DQ)⁵ y CCSD(T),⁶ la metodología *ab initio* pura (no extrapolativa) más exacta disponible en términos prácticos para sistemas orgánicos de tamaño medio.⁷ En particular se demostró que las máximas desviaciones en estados de transición estuvieron por debajo de 2.5 kcal/mol respecto del nivel CCSD(T)/6-311G(d,p).^{8,9}

Se tomó en cada caso al cero de referencia como la energía libre estándar de los reactivos, a partir de los cuales se trazó el perfil energético de las vías para su comparación. El balance de carga y masa se realizó con TFAH/TFA⁻ (ácido trifluoroacético, solvente empleado

experimentalmente y su anión), tres moléculas de formaldehído y las dos moléculas de aminas aromáticas reaccionantes.

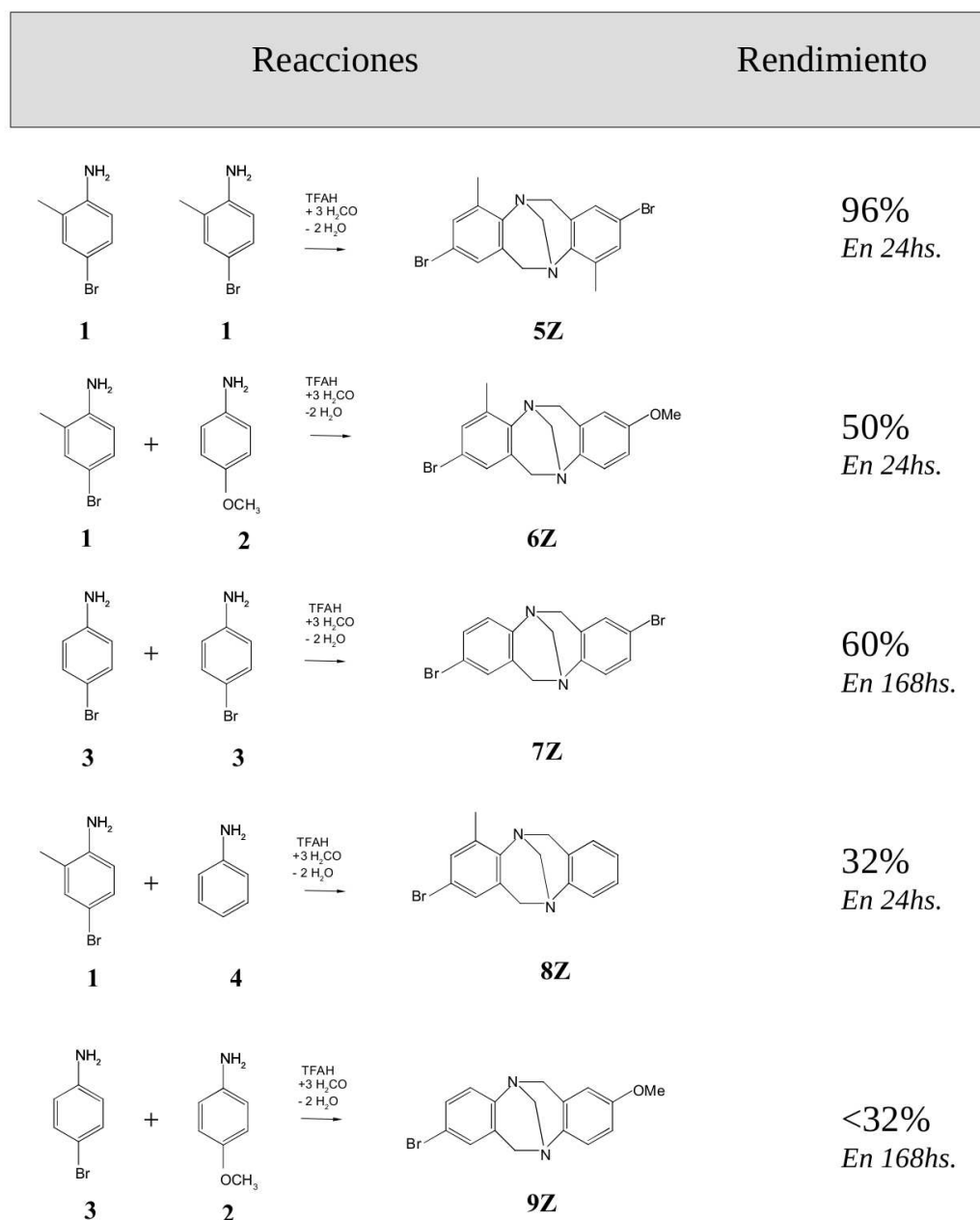


Figura 4.1. Síntesis experimentales aportadas por el grupo en colaboración de la UNC (Detalles en Información Suplementaria secc. 4).

Se exploraron las superficies de energía libre para todas las vías razonables y sus posibles bifurcaciones para alcanzar el producto de base de Tröger deseado, tomando una serie de síntesis modelo que se efectuaron en colaboración con el grupo de la UNC de la Prof. Moyano. En la Figura 4.1 se resumen los resultados experimentales para la obtención de las bases de Tröger **5Z**

– **9Z**. La finalidad de estas síntesis fue esencialmente comprender el mecanismo. No obstante, algunos de estos productos fueron derivatizados con reacciones conocidas sustituyendo el bromo para llegar a compuestos más interesantes desde el punto de vista de su fotofísica, como los discutidos en el capítulo anterior. (Estas reacciones no fueron el cuello de botella de la síntesis sino la obtención del esqueleto Tröger bromado, como los de **6Z**, **8Z** y **9Z**).

4.1 Reactividad en las reacciones modelo.

Dada la complejidad del mecanismo se discutirá primero en detalle la formación del derivado simétrico **5Z** (Figura 4.1) a partir de **1 + 1** en la sección 4.2. Los perfiles energéticos de esta reacción se tomarán como referencia. Si bien las díadas simétricas no serían capaces de separar carga, revisten interés en aplicaciones tan diversas como la farmacología y la nanotecnología. En este último campo, justamente, comenzó el grupo a enfocar su interés en derivados Tröger simétricos¹⁰ como dispositivos capaces de actuar como compuertas lógicas.¹¹ Luego, en la sección 4.3 se describirá la obtención del derivado asimétrico **6Z**. Como se puede observar en la Figura 4.1, ambas reacciones tienen altos rendimientos en tiempos razonables, siendo el rendimiento de **6Z** sólo disminuido por la probabilidad estadística de reacciones laterales **1 + 1** y **2 + 2** en competencia con **1+2 → 6Z**. En otras palabras el reemplazo de un grupo atractor de electrones como el Br por uno fuertemente donador como el OMe tiene apenas efecto, lo que plantea la primera peculiaridad. Por otra parte, resultó particularmente intrigante por qué si la reacción **3 + 3 → 7Z** resultaba lenta (7 días), con menor rendimiento y aparición de un producto de mayor peso molecular que **7Z** y otros subproductos, en comparación con la reacción "limpia" y con alto rendimiento **1 + 1** (95% producto aislado en 24 hs), siendo que **1** y **3** sólo difieren por la sustitución de un CH₃ por un H en la posición 2 de la anilina. Se compararon las diferentes vías entre **1+1** y **3+3** en la sección 4.4. La ausencia de este metilo también impactó drásticamente en la síntesis asimétrica **2 + 3 → 9Z**, que también solo da rendimientos razonables después de 7 días de reacción (Figura 1). El resto de las síntesis fueron estudiadas con el mismo detalle pero se mencionarán comparativamente y la información completa se deja disponible en la Información Suplementaria (secc. 4).

El estudio de las superficies de energía libre de todas estas vías sirvió no sólo para aclarar las cuestiones aquí planteadas sino que también brindó una descripción detallada de todo el mecanismo de reacción y los principales determinantes de reactividad.

4.2 Reacción (1 + 1 → 5Z) y mecanismo general.

Aunque hay propuestas de fragmentos del mecanismo variadas y hasta contradictorias en bibliografía, se puede describir un acuerdo general que consiste en un inicio promovido por el ataque electrofílico del primer formaldehído a una anilina, seguido de condensaciones de anilina y entrada de otros dos formaldehídos en algún orden. Todas las vías propuestas se resumen en la Figura 4.2.

La forma energéticamente más favorable para que se produzca el ataque del primer formaldehído se determinó que es cuando éste ataca al carbono aromático en posición *orto* a la amina. Como se puede apreciar en la Figura 4.3, esta es, en términos de su función de Fukui, f^+ ,ⁱ la posición preferida para el ataque del electrofílo. Aunque algunos autores postulan que el primer formaldehído ataca al nitrógeno de la anilina, ambas posibilidades están calculadas y consideradas en la Fig. 4.2. Sin embargo, se ve que, como era de esperarse por el análisis de la f^+ , el ataque al anillo (**TS-B-CC**, Fig 4.2) conduce a un estado de transición de 11 kcal/mol más bajo que el ataque al nitrógeno (**TS-B-C**, Fig. 4.2). De aquí se deduce que la vía preferencial desde el punto de vista cinético por la Vía **I** (azul en la Fig 4.2, **5BB** → **5CC** → **5DD** → **5EE**) en vez de continuar por la Vía **II** en verde **5C** → **5D** → **5E**.

Asimismo, para obtener el siguiente intermediario **CC**, se analizaron dos estados de transición posibles. En todos los casos, la protonación del formaldehído sucede en un mecanismo concertado que involucra la transferencia de un protón desde el -NH₂ de una anilina.

El primer estado de transición posible para los reactivos, **TS-B-CC-1**, consiste en la protonación del formaldehído por parte de un amonio, lo cual favorece el carácter electrofílico del formaldehído y su acercamiento al carbono en posición *orto* del anillo de otra amina no protonada (escasa en medio ácido). El **TS-B-CC-2**, describe el mecanismo de transferencia de protón concertado por parte de la misma amina protonada que sufre el ataque electrofílico: a medida que el protón de la amina se aleja del N de la anilina y se acerca al O del carbonilo, el C carbonílico comienza a ganar carácter de carbocatión, atacando al anillo y rompiendo su aromaticidad. En cualquiera de los dos casos, y también para las otras reacciones (obtención de **6Z-9Z**) es la formación de este intermediario desaromatizado el estado de transición de más alta energía libre de todo el proceso, se ilustra para **5TS-B-CC-2** en la Figura 4.4.

i Cap. 2, sección 2.2.

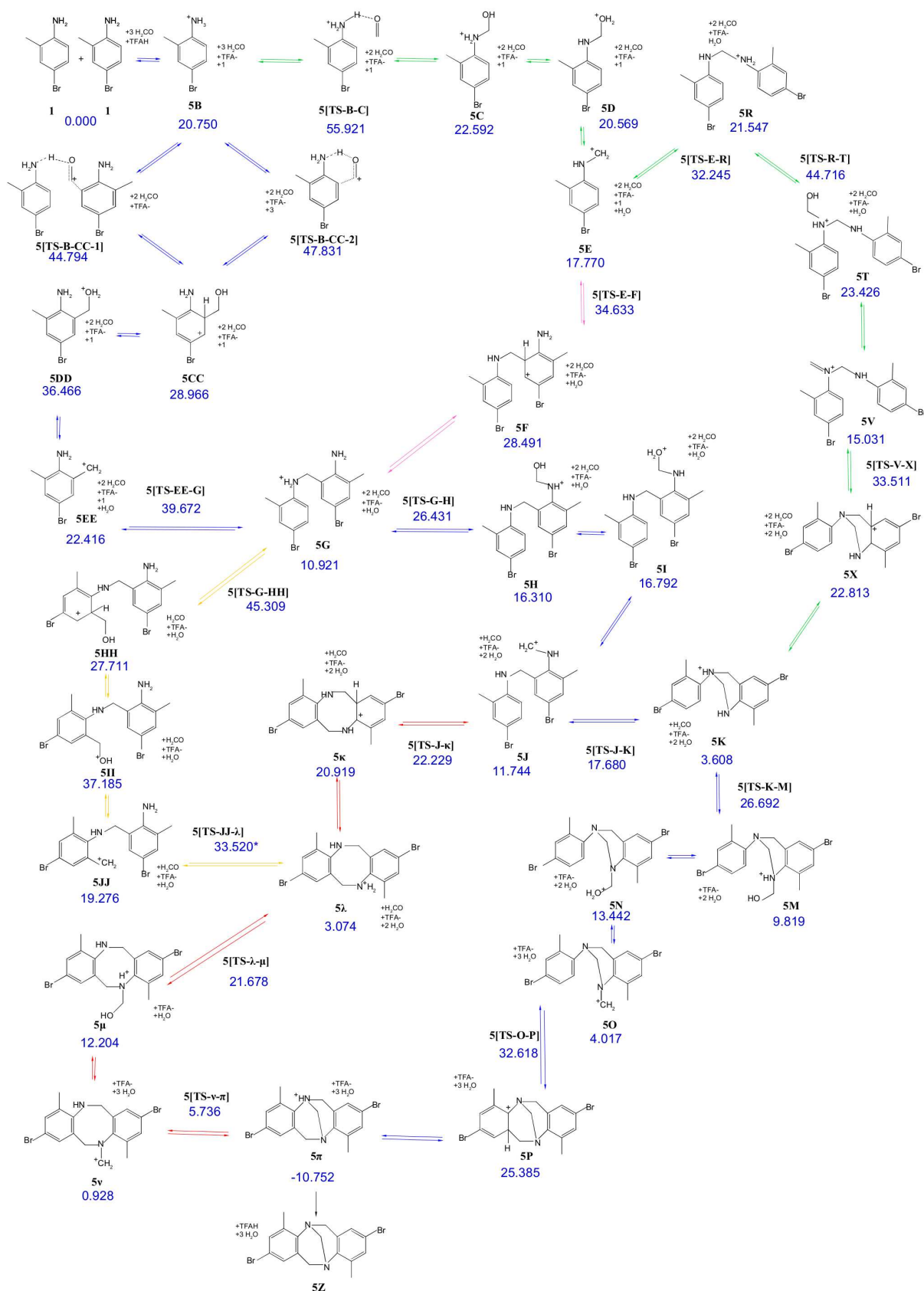


Figura 4. 2. Mecanismo calculado para $1 + 1 \rightarrow 5Z$. Energías libres (ΔG^0) relativas en kcal/mol. Los colores de las flechas corresponden a las *Via I*, *Via II*, *Via III*, *Via IV* y *Via V*.

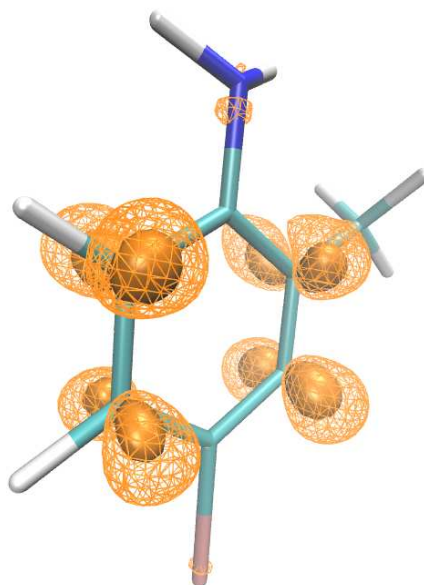


Figura 4.3 Representación de la función de Fukui f^+ que indica la posición preferencial para el ataque del electrófilo en la posición 6 del anillo.

Continuando por esta vía **I** (flechas azules en la Figura 4.2) el intermediario desaromatizado **5CC** tautomeriza rápidamente a **5DD**, que rinde **5EE** por pérdida de una molécula de agua. En adelante todos los equilibrios tautoméricos se considerarán equilibrios rápidos asistidos por el solvente prótico, de ahí que no se reportan los estados de transición entre tautomerizaciones (tampoco para pérdidas de molécula de agua).ⁱⁱ Este procedimiento fue plenamente justificado en el estudio recientemente publicado de un mecanismo similar, aún cuando el solvente no fue tan buen donador de protones como en este caso.⁹

Continuando por la vía **I** carbocatión **5EE** ataca una anilina neutra pasando por el **5TS-EE-G** (Fig 4.2, azul) para dar el intermediario **5G**, que es el primer intermediario de cierta estabilidad, de cuya existencia hay evidencia experimental (véase más adelante). **5G** podría haber sido formado a través del camino verde y luego lila en la Fig 4.2 (vía **II** y vía **III**), pero como se demostró, tales procesos tienen una probabilidad mucho menor teniendo en cuenta que provienen

ii También para simplificar el seguimiento de la Fig 4.2, sólo se señalarán en una discusión posterior las bases conjugadas de algunas de estas especies (obtenidas al terminar o quenchar la reacción, al neutralizar el ácido) en los casos que resulte relevante la comparación con algún intermediario aislado.

de un TS extremadamente alto (**5TS-B-C**, 55.9 kcal/mol). En la Figura 4.5 se comparan, con los mismos colores de la Fig 4.2, los perfiles de energía libre de los diferentes caminos para **1 + 1** → **5Z** superpuestos; compárese los perfiles azul contra verde y lila hasta llegar a **5G**.

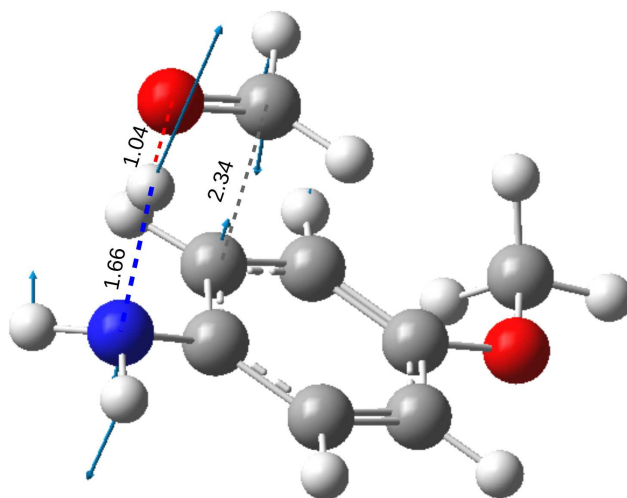


Figura 4.4. Geometría del primer estado de transición de los mecanismos. Resultó el más alto en energía libre para la vía más probable en todas las síntesis, **5Z** a **9Z**, se muestra el **6TS-B-CC-2** como representativo. De todos modos, es de menor energía que el correspondiente a la hipótesis de que el primer formaldehído ataque al nitrógeno de anilina, también en las 5 reacciones estudiadas. Los vectores en celeste indican los desplazamientos correspondientes a la coordenada de reacción con la frecuencia imaginaria de $308 i \text{ cm}^{-1}$.

El intermediario **5G** puede promover la entrada del segundo metileno, es decir la segunda entrada de formaldehído seguido de liberación de H_2O . Una posibilidad es el ataque a uno de los anillos, posibilidad que sería descartada, dado que el mejor de los intentos en términos de energía libre de activación fue el **5TS-G-HH** (Fig 4.2), que resulta casi 20 kcal/mol más energético que la otra alternativa para **5G**, que es el ataque a un nitrógeno de anilina pasando por **5TS-G-H** para formar **5H**, que luego tautomeriza y desprende agua para dar **5J**. La notable diferencia entre los dos TSs permite descartar la vía **IV** (amarillo en la Fig. 4.2, nótese la altura de los TSs involucrados en los perfiles verde y amarillos de la Fig 4.4) y continuar por la vía **I** (azul). Tanto el hecho de que en este caso el H_2CO tiene preferencia por el N de amina, como así también la notable mayor facilidad con la que entra el segundo formaldehído en comparación con el primero, pueden racionalizarse en virtud de la fuerte estabilización electrostática y por puentes de

hidrógeno que se dan en **TS-G-H**, donde uno de los nitrógenos actúa como donador del protón que activa el H₂CO que ya está perfectamente orientado para atacar el otro nitrógeno (Figura 4.6).

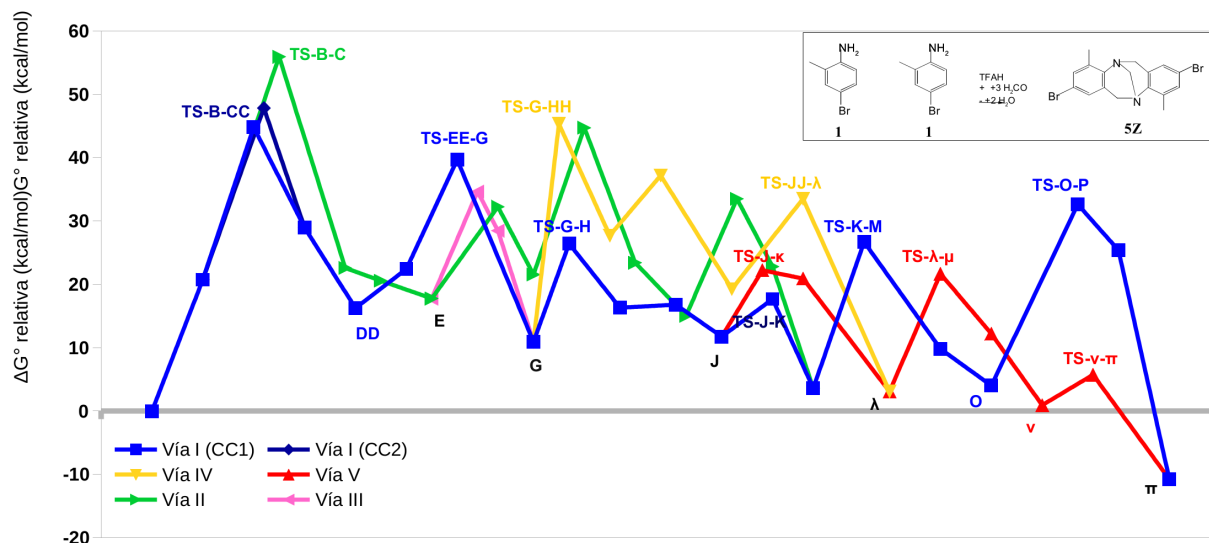


Figura 4.5 Perfiles de energía libre relativa para (1+1 → 5Z)

El intermediario **5J** así obtenido (Fig. 4.2) podría ahora tanto condensarse para cerrar el ciclo alifático de 6 miembros **5K** continuando por la vía **I** (azul) o cerrar el ciclo de 8 miembros **5κ** y continuar por la vía **V** (rojo). La diferencia entre los dos caminos a nivel de esta bifurcación no es tan grande como las discutidas anteriormente (menos de 5 kcal/mol entre **5TS-J-K**, en azul, y **5TS-J-κ** en rojo) y están conectadas por pasos reversibles y tautomerizaciones; por otra parte, para otras de las síntesis es aún menor. Por lo tanto volveremos a analizar la posibilidad de tomar el camino en rojo (vía **V**) más adelante.ⁱⁱⁱ

Continuando por la vía **I**, el intermediario **5K** promueve la tercera y última adición de metileno. De nuevo este formaldehído entra de manera similar al TS de la Fig 4.6, con el formaldehído a modo de "sandwich" entre un nitrógeno positivo que lo va protonando al O del H₂CO a medida que su C carbonílico ataca al otro nitrógeno (**5TS-K-M**). Como tendencia general, que se verá también en las otras síntesis, las entradas del segundo y tercer H₂CO en estas conformaciones tendrán energías de activación de entre 10 y 24, contra las 45 kcal/mol o más del primer H₂CO. Una vez adicionado el H₂CO, siguen pasos de tautomerización y pérdida de H₂O

iii Nótese también, que en el caso de las otras bifurcaciones que prácticamente se han descartado (amarillo, verde y lila), la energía del estado de transición menos probable está a energías comparables e incluso mayores que el **TS-B-CC**, hasta ahora el estado que controlaría la velocidad. En este caso tanto **TS-J-K** como **TS-J-κ** (Fig. 4.2) están claramente por debajo de las 44.8 kcal/mol de la entrada del primer metileno (**TS-B-CC-1**).

generando un intermediario relativamente estable, **5O**. El paso final para completar el bicyclo alifático del puente Tröger es el ataque intramolecular del catión **5O** al anillo formando el último enlace C-C (Figura 4.7). Este paso involucra el estado de transición muy energético **5TS-O-P** (energía relativa 32.6 kcal/mol, activación de 28.6 kcal/mol, perfil azul en la Fig 4.5), que forma un intermediario tipo Meisenheimer **5P**, que rápidamente tautomeriza para dar **5π**.

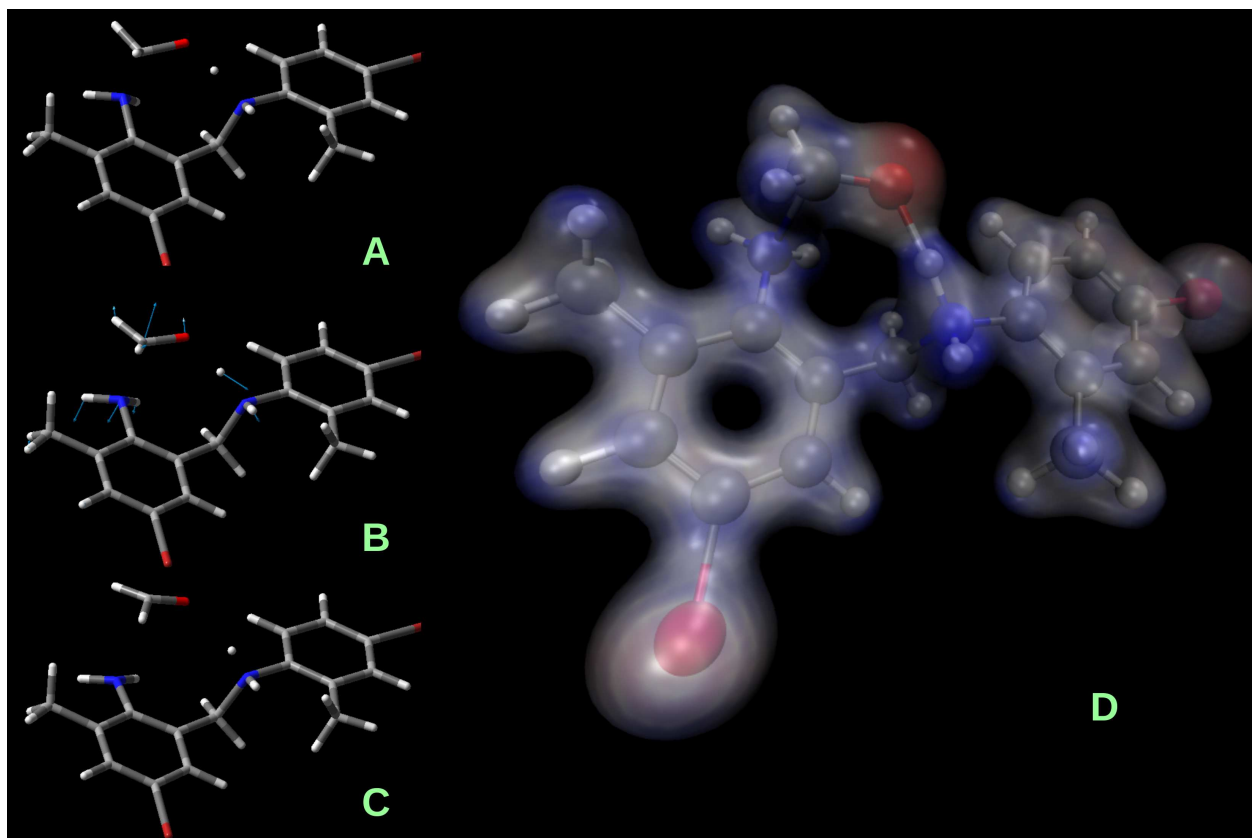


Figura 4.6. Estado de transición **5TS-G-H** para la entrada del segundo formaldehído a través de la Vía I. A) Estructura sobre la coordenada intrínseca de reacción (IRC) 0.5 u.a. antes del TS. B) Estructura del TS, los vectores celestes corresponden al modo normal con la frecuencia imaginaria $268 i \text{ cm}^{-1}$. C) Estructura sobre la IRC 0.82 u.a. pasado el TS. D) Isosuperficie de densidad electrónica 0.05 e, coloreada de acuerdo al potencial electrostático molecular, de (-) rojo a (+) azul (-0.01 a +0.05 u.a.).

El catión rearomatizado **5π** (-10.8 kcal/mol) es finalmente el ácido conjugado del producto buscado **5Z** (-26.5 kcal/mol), que se obtiene al neutralizar la reacción (se precipita **5Z** con NH_4OH). El estado de transición **5TS-O-P**, puede tener una cierta participación en el control de la cinética por esta vía. Si bien el TS más alto es **5TS-B-CC** para la primera entrada de formaldehído, luego de la formación irreversible de un intermediario estable como **5O** (que es aun más estable en otras síntesis, como las de **6Z**, **7Z** y **9Z**, incluso más que el material de partida

$\Delta G_{\text{rel}}^0 < 0$), viene inmediatamente después un estado de transición alto, se puede estar en una situación de dos *regiones* determinantes de la velocidad [una de (reactivos $\rightarrow \rightarrow \dots \rightarrow \mathbf{O}$) y otra de ($\mathbf{O} \rightarrow \mathbf{TS-O-P} \rightarrow \rightarrow \dots$ producto)] en vez de una única *etapa* determinante. Este análisis de regiones o estados determinantes,¹² resulta más riguroso que la localización de la *etapa determinante* (TS más alto) y se discute en detalle en las referencias 8 y 12. Desde este punto de vista, aunque no parece ser el caso de $1+1 \rightarrow 5Z$, no se descarta que, jugando con diferentes sustituyentes, la vía **V**, en rojo, pueda tener una cierta injerencia en el control de la velocidad global, dado que no pasa por este TS alto **TS-O-P**.¹³ La vía **V** (rojo) es similar en varios aspectos a continuar por la Vía **I**, en el sentido de que una vez condensado uno de los ciclos alifáticos del biciclo del puente Tröger ($5J \rightarrow \mathbf{TS-J-\kappa} \rightarrow \kappa \rightarrow$ tautomeriza a λ), se adiciona el último formaldehído y elimina agua ($5\lambda \rightarrow \mathbf{TS-\lambda-\mu} \rightarrow \mu \rightarrow \mathbf{v}$) y se forma un catión $5v$ que debe condensar el biciclo finalmente. Este último paso ($5v \rightarrow \mathbf{TS-v-\pi} \rightarrow \pi$) requeriría menos activación (4.8 kcal/mol) que en el caso de la $5\mathbf{TS-O-P}$, dado que no involucra la desaromatización de un anillo.

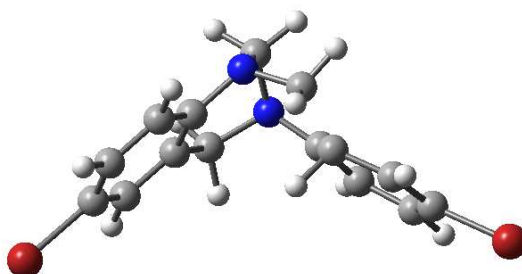


Figura 4.7: Estado de transición para el cierre final del puente Tröger. Por claridad se muestra para $7\mathbf{TS-O-P}$

Modelado, diseño racional y desarrollo de compuestos de interés tecnológico y farmacológico

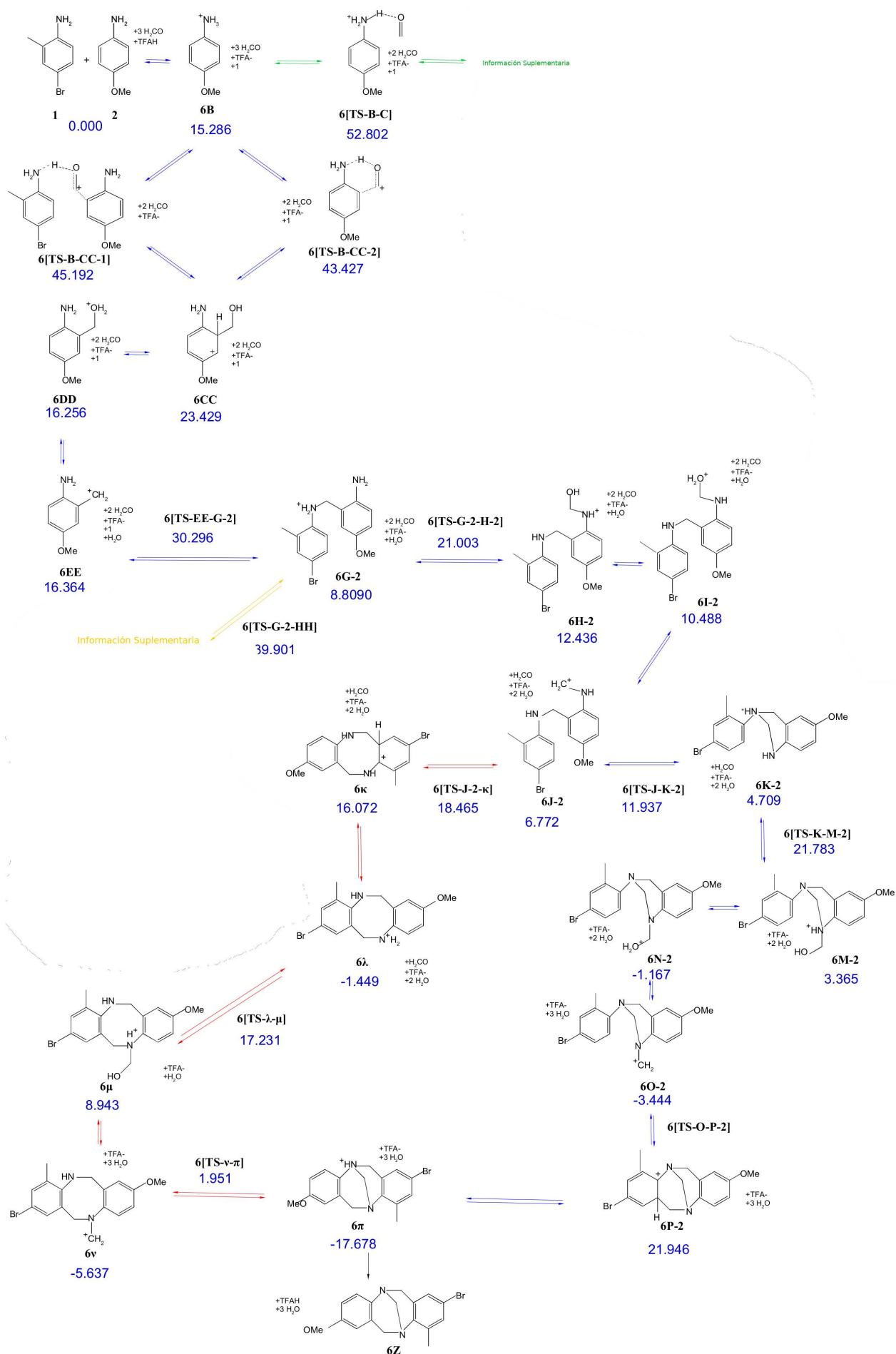


Figura 4. 8. Principales pasos del mecanismo 1+2 → 6Z. Colores como en la Fig 4.2

4.3 Reacción de (1 + 2 → 6Z) como modelo de síntesis asimétrica.

En este caso habrá una disminución trivial de la proporción de producto deseado, por la posibilidad de que se den las reacciones 1+1 y 2+2, además de la 1+2. Aún enfocando sólo todas las posibles vías razonables para 1+2 aparecerán más complejidades, por lo que se discutirá sólo los caminos de menor energía libre dejando la demostración (es decir la consideración de otras posibles vías como la amarilla, la lila y la verde discutidas en detalle en la sección anterior) como Información Suplementaria. En la Figura 4.8 se presenta un esquema simplificado las vías más probables para la formación de 6Z, y se discutirán como referencia del proceso asimétrico, las reacciones (1+4 → 8Z) y (3 +2 → 9Z) que se mencionarán comparativamente en algunos casos (esquemas completos como 4.2 en la Información Suplementaria del capítulo).

La vía I es similar a la obtenida en el caso simétrico (se verificó que la menor energía libre involucra comenzar con el ataque a la anilina más nucleofílica, 2), con un primer estado de transición (de mayor relevancia cinética) sólo ligeramente inferior al caso de 1+1. Luego se sigue una serie de pasos de acople de anilinas y entrada del segundo formaldehído hasta llegar a 6J-2 (otra posible 6J es con la carga positiva formal sobre el esqueleto que provenía de 1, detalles en la Info Suplementaria). Luego viene la misma disyuntiva que en el caso simétrico, con 6.5 kcal/mol a favor del TS que cierra el ciclo alifático de 6 en vez del de 8 miembros (6TS-J-K-2 vs. 6TS-J-κ-2. Fig. 4.8). Continuando por la vía I (azul), ingresa el segundo y el tercer formaldehído, llegando al intermediario estable 6O ($\Delta G_{rel}^0 = -3.4$ kcal/mol). La principal diferencia con respecto al caso de 5O, es que la energía relativa del 6TS-O-P-2 para el cierre del puente Tröger es ahora menor (27.2 vs. 32.6 kcal/mol en el caso de la Tröger simétrica). Para los TSs análogos, en el caso de 8TS-O-P y 9TS-O-P también se obtienen energías relativas menores (24.7 y 24.5 kcal/mol respectivamente) comparados con la simétrica. La comparación de los perfiles de energía libre relativa por esta vía para (1+1 → 5Z) y (1 +2 → 6Z) se muestra en la Figura 4.9. No se observan diferencias significativas en las regiones cinéticamente más críticas de los perfiles, lo que está en buen acuerdo con la reactividad y distribución de productos observada en el laboratorio.

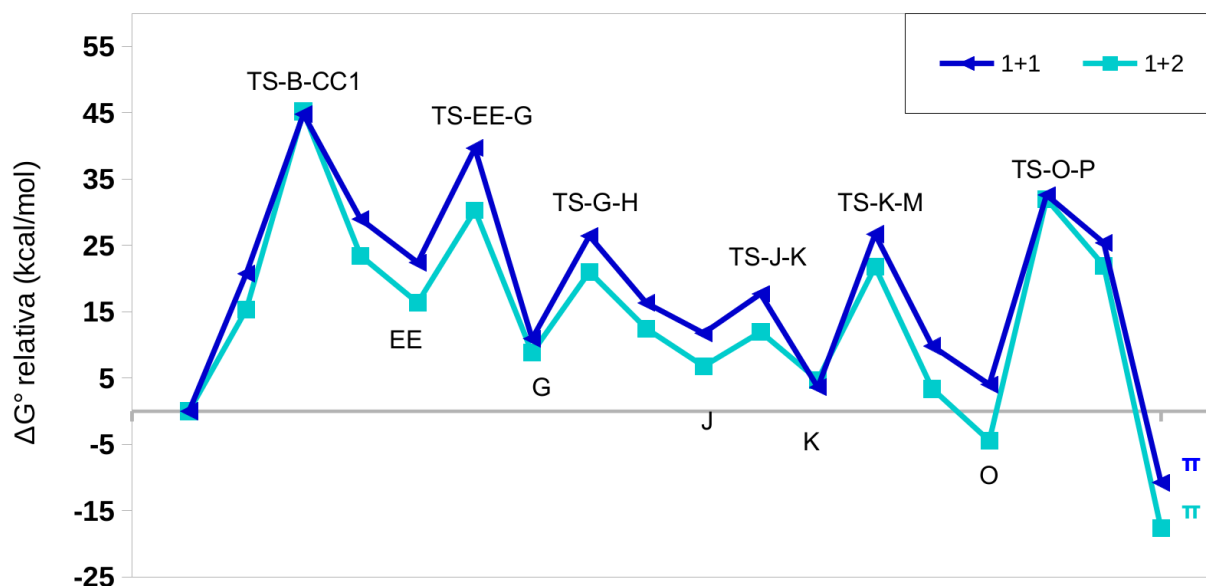


Figura 4. 9. Perfiles de energía libre relativa. Superposición de (1+1 → 5Z) y (1+2 → 6Z)

4.4 Reacción (3 + 3 → 7Z) y posibles subproductos.

En la Figura 4.10 se muestra el esquema completo para la producción de 7Z partiendo de 3, que sólo difiere de 1 en el metilo en la posición 2 de la anilina. Las energías y propiedades de todos los intermediarios y TSs en el esquema son muy similares a 1+1 (Compárese con la Fig. 4.2). La principal diferencia respecto de la otra síntesis simétrica (y también respecto de 1+2) es la mayor energía de activación del último cierre del biciclo de Tröger, el 7TS-O-P, con una energía relativa de 33.1 kcal/mol. El intermediario estable 7O puede vivir lo suficiente para recibir un cuarto H₂CO y posteriormente acoplarse con otra anilina como se muestra en la vía alternativa VII (marrón) en la Figura 4.11.

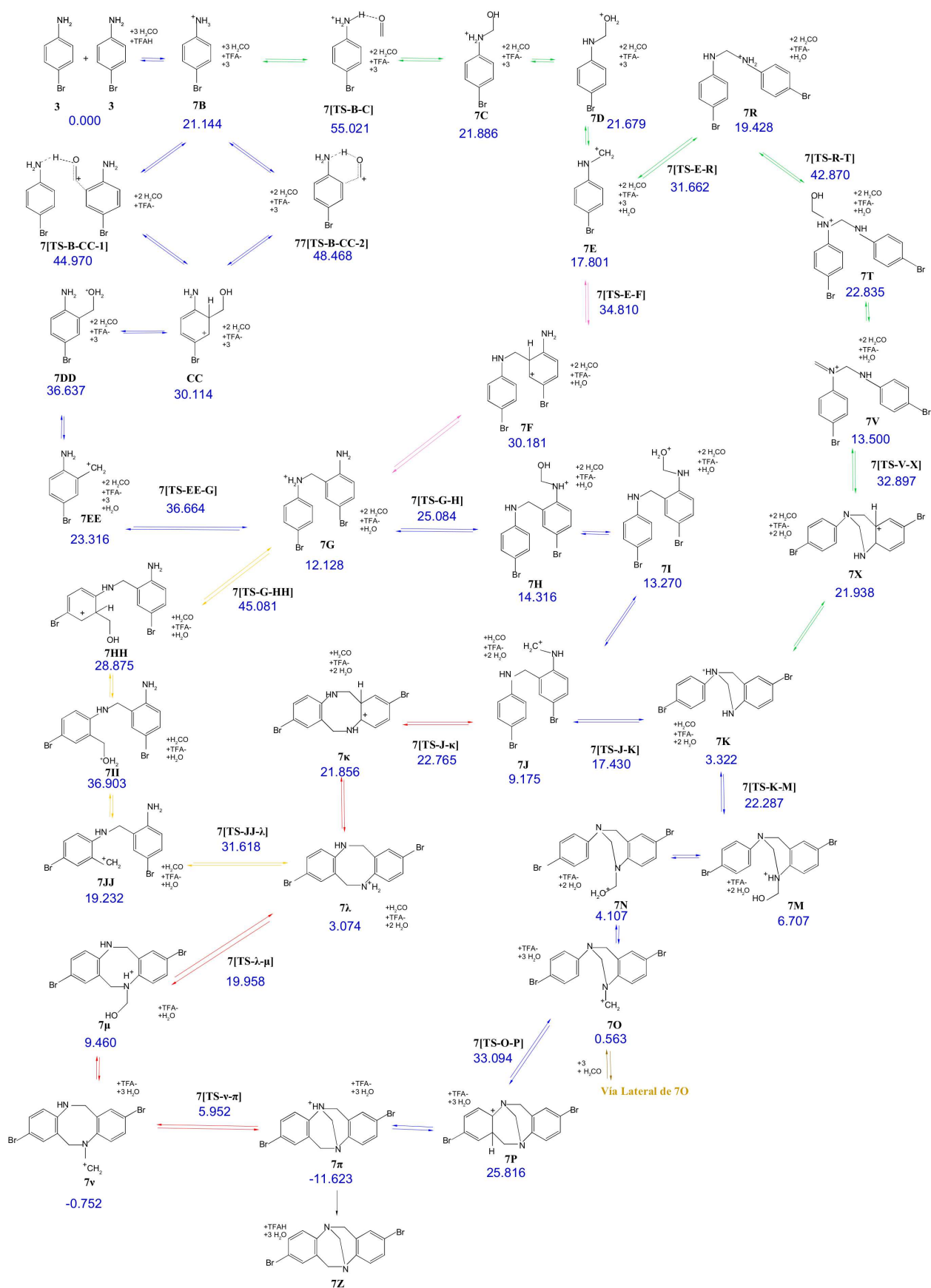


Figura 4.10. Mecanismo principal para la la reacción $(3 + 3 \rightarrow 7Z)$ (Colores como en los esquemas anteriores)

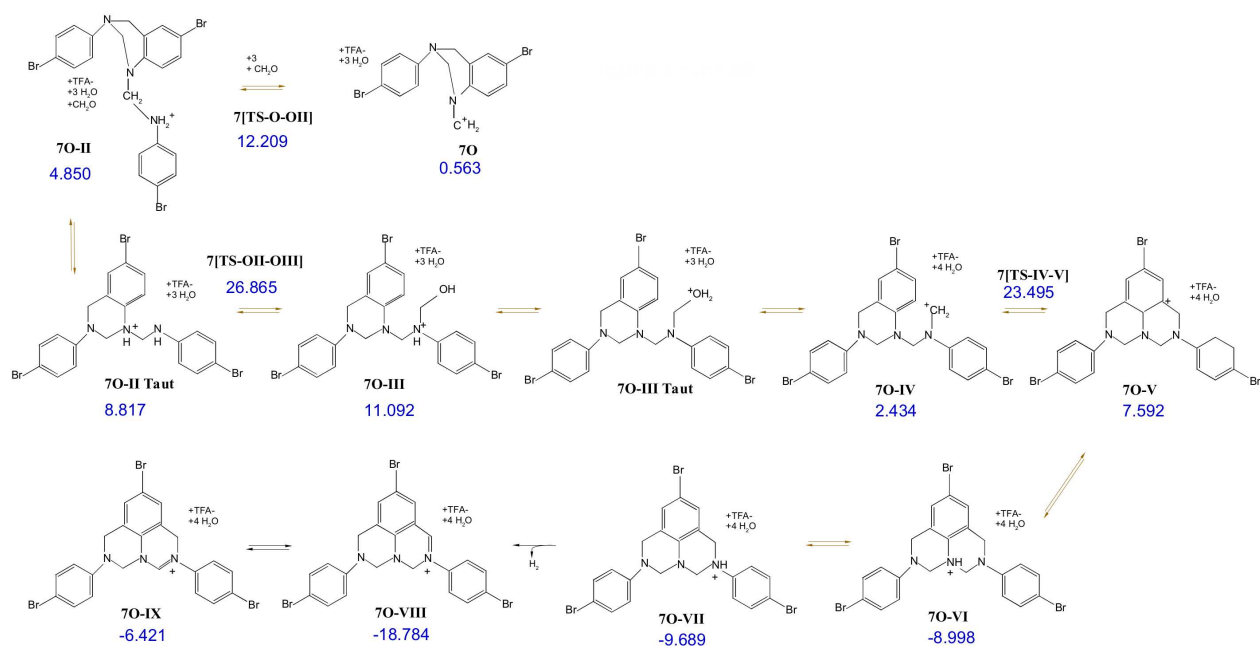


Figura 4.11. Mecanismo para 3+3, colateral. Vía VII alternativa para rendir el subproducto 7O-VII.

Esta vía finalmente conduce al aducto de mayor peso molecular 7O-VII, que es termodinámicamente casi tan estable como el producto buscado 7π (Figs. 4.10-11, perfiles en la Figura 4.12). De hecho, su base conjugada (7O-VII deprotonado) está caracterizada^{14 15} y conocida por su nombre trivial diazajulolidina, también su derivado 7O-VIII fue identificado por masas/electrospray.^{iv} Para que se formen estos aductos es necesario atravesar un estado de transición cuya energía relativa es menor que la de 7TS-O-P que por la vía azul que conduce al producto buscado 7π. En el caso de la reacción 1 + 2, este TS está a mayor energía que su TS-O-P. En el caso de la reacción 1+1, la vía en sí misma no está disponible, dado que la posición que debería ser atacada electrofílicamente en el anillo para formar el subproducto estable está sustituida con el CH₃.

iv En realidad 7O-VIII y 7O-IX se incluyen en el esquema aún cuando no podrían formarse en las condiciones de catálisis ácida empleadas, pero se incluyen para compara estabildades relativas. El desprendimiento de H₂ no es observado en condiciones experimentales, pero fueron identificados por otros autores.

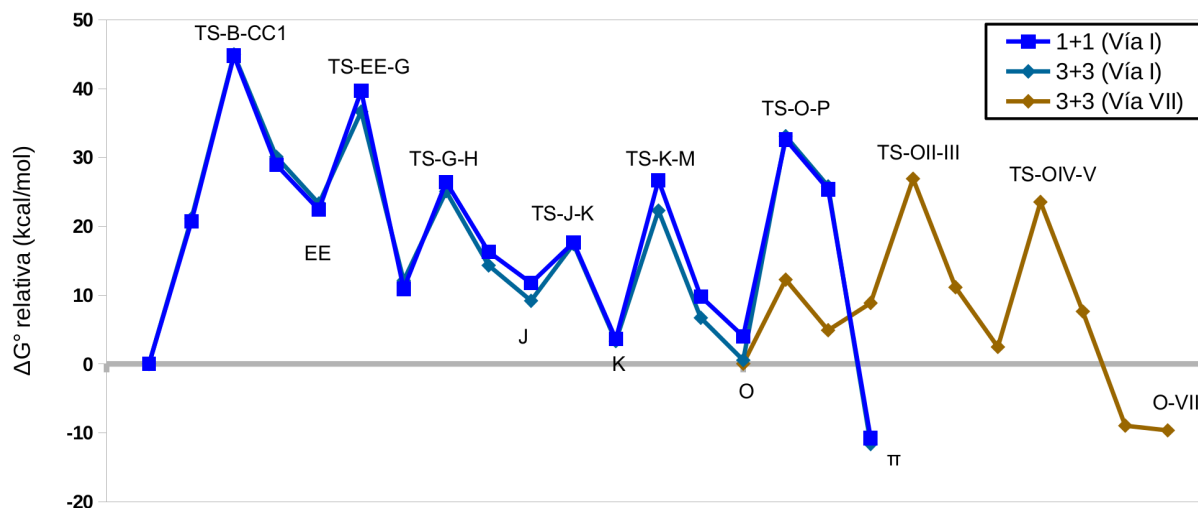
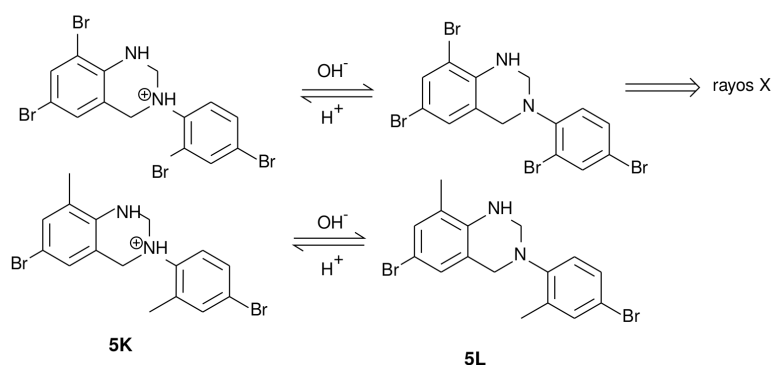


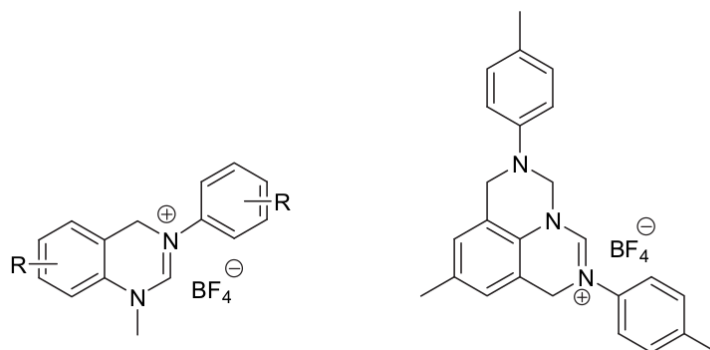
Figura 4.12. Comparación de los perfiles de energía libre relativa para las síntesis 1+1 (anilinas con Me en orto) a través de la Vía I (azul) versus el perfil para la síntesis 3+3 (anilina sin Me en orto) en turquesa. Una vez formado el intermediario estable 7O, éste puede continuar por el camino en marrón, conduciendo a la formación del aducto 7O-VII.

4.5 Evidencia de compuestos aislados e identificados

Sergeyev *et al.*¹⁶ obtuvieron la estructura de rayos X del intermediario **K**, más precisamente de su base conjugada, cuando se neutraliza usando una anilina similar a **1**, la 2-4-dibromoanilina



Recientemente, fueron aislados e identificados dos subproductos o intermediarios más por parte de Yu Wan *et al.*¹⁹ que corresponden a un intermediario estable, **O**, seguido de un TS alto y de relevancia crítica en la discusión presentada (**TS-O-P**, Fig 4.12) y también un intermediario que sería un subproducto estable en la reacción **3+3** → **7Z** (Fig 4.12). Los compuestos en cuestión, que fueron aislados como sales de tetrafluoroborato para determinar sus estructuras de rayos X:¹⁹



El de menor peso molecular es explicado por los autores como proveniente de **O** isomerizado en las condiciones de líquidos iónicos en las que realizan esta reacción. El de mayor peso es precisamente la sal de **7O-VIII**, indicado como derivado de **7O-VII**. Abella *et al.*²⁰, por su parte, directamente aislaron y caracterizaron **7O-VII** desprotonado (diazajulolidina). Tanto Wan como Abella^{19 20} hicieron Trögers simétricas y encontraron **7O-VII**, que en nuestra propuesta mecanística genera un problema que disminuirá el rendimiento para las anilinas con las dos posiciones *orto* libre. En efecto, todas las reacciones llevadas a cabo por estos dos grupos involucran anilinas con las posiciones *orto* libres (Wan, por ejemplo, tiene sustituyentes 4-Me-, 4-F-, 4-Cl-, 4-Br-, 3-Cl-4-F- y 3-Cl-4-Me, ninguna 2-sustituida) Por el contrario, los autores discutidos anteriormente nunca vieron **7O-VII** ni sus derivados relacionados con esta vía, trabajando con anilinas sustituidas en la posición *orto*.

Todas estas observaciones, como así también los rendimientos y distribución de productos obtenidos en la UNC estarían en excelente acuerdo con los mecanismos propuestos para las síntesis simétricas y asimétricas de díadas Tröger. Hasta donde sabemos, la única aparente contradicción que podríamos esperar es la propuesta de un intermediario **7E**²⁰ (vía **II**, verde, Figura 4.2) descartado en nuestros cálculos. Pero en agudo contraste con los intermediarios identificados discutidos hasta aquí, que fueron aislados, purificados y caracterizados por rayos X, esta propuesta se basaría en bibliografía previa y las masas obtenidas en ESI-MS. Pero claramente **7E** y **7EE** tienen la misma masa porque son isómeros, pero con una diferencia de más

de 10 kcal/mol en el estado de transición más alto del sistema (Fig 4.5, perfiles azul vs. verde); tal diferencia estaría muy por encima de los errores esperados para este nivel de teoría, si consideramos sus pequeñas discrepancias obtenidas en un sistema similar con CCSD(T)/6-311+G(d,p).⁸

4.6 Conclusiones

Se llevó a cabo el estudio del mecanismo de reacción de las díadas con base de Tröger a partir de anilinas sustituidas con formaldehído como fuente de metilenos en ácido acético, mediante cálculos computacionales a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p). Se logró comprender diversos aspectos de su síntesis, explicar los rendimientos experimentales e información útil para optimizar la obtención de las díadas con base de Tröger.

Se propusieron los mecanismos que conducen a la formación del producto mediante diversas vías. El efecto de los sustituyentes en la anilina de partida también se analizó y se discriminó de acuerdo con el papel que jugaron en cada paso del mecanismo completo. Todos los destinos razonables se estudiaron considerando las tautomerizaciones posibles.

Los cálculos revelaron que las vías estudiadas muestran coordenadas de reacción con particularidades en común. El primer TS involucrando la entrada del primer formaldehído corresponde al paso cinéticamente más costoso. Éste sería un TS que podría controlar la velocidad de reacción, al menos parcialmente. La posibilidad de una zona de control de velocidad hasta **O** y otra partiendo del **TS-O-P** también fue discutida. En algunos casos, un intermediario estable como **O** puede reversiblemente hacer que tenga alguna participación la vía **II**, lo que no afectaría en general la predominancia del producto deseado. No obstante, desde **O** puede seguirse una vía no productiva involucrando una región donde hay un TS de menor energía que **TS-O-P** que puede habilitar la producción del compuesto de mayor peso molecular **O-VII**. Esta complicación estaría afectando en parte a la síntesis **3+2** y marcadamente a la **3+3**, como se observó experimentalmente. Este problema se solucionaría fácilmente bloqueando la posición orto de la anilina. En efecto, la aparición de **O-VII** y/o sus derivados se encuentra experimentalmente con facilidad en anilinas con las dos posiciones *orto* libres. Otros intermediarios, de energías relativas bajas precediendo estados de transición altos en esta propuesta están respaldados por la evidencia cristalográfica de los mismos o sus sales o derivados.

El mapeo de estas superficies de energía potencial permitirá elegir racionalmente anilinas que faciliten mayores rendimientos. Los límites de la versatilidad del formaldehído como fuente de metilenos y la colección de puntos estacionarios caracterizados permitirían hacer cálculos sencillos en las regiones de la superficie más críticas a fin de considerar diferentes posibilidades sintéticas (diferente fuente de metileno, catalizador, sustituyentes en las anilinas entre otras condiciones).

Más allá del interés práctico en el marco del proyecto de diádas, que permitirá al grupo generar con mayor facilidad una variedad de derivados con interesantes aplicaciones, se remarca que este es, hasta donde sabemos, el primer estudio mecanístico que describe de forma detallada y completa del *mecanismo para la síntesis de bases de Tröger* tanto simétricas como asimétricas a partir de anilinas.

- (1) B. Dolensky, J. Iguero, V. Král, C. Pardo, M. Valík. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2007**, *93*, 1–56.
- (2) Yuan, R.; Li, M.; Xu, J.; Huang, S.; Zhou, S.; Zhang, P.; Liu, J.; Wu, H. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 4081.
- (3) N. Classens, F. Perard, C. Bresson, C. Moucheron, A. K. D. Mesmaeker. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 987.
- (4) M. S. Sigman, D. R. Jensen. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 221.
- (5) K. Raghavachari, M. J. Frisch, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 4244–4245.
- (6) J. Pople, M. Head-Gordon and K. Raghavachari. *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 5968.
- (7) G. Scuseria, C. Janssen and H. Schaefer. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 7382.
- (8) I. Malvacio, E. L. Moyano, D. M. A. Vera, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 83973–88981.
- (9) J. P. Colomer, M.-L. Sciú, C.L. Ramirez, D.M.A. Vera, E. L. Moyano. *European Journal of Organic Chemistry.* **2018**(13), 1514–1524.
- (10) C. L. Ramirez, L. Trupp, A. Bruttomesso, V. T. Amorebieta, D. M. A. Vera, A. R. Parise, "Charge transfer properties of Troger base derivatives", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 20076–20080
- (11) C. L. Ramirez, R. Procaccini, C. A. Chesta, A. R. Parise, D. M. A. Vera, " Selective charge transfer in donor/acceptor systems bridged by Troger base derivatives", *Organic Electronics*, **2013**, *14*, 2564–2572.
- (12) S. Kozuch and J. Martin, *ChemPhysChem*, **2011**, *12*, 1413–1418.
- (13) Dentro de el proyecto interdisciplinario, se pretende continuar la síntesis de otras díadas partiendo de anilinas con diferentes sustituyentes, como así también aminocarbazoles y aminas de otros heterociclos. a) D. Dusso, P. A. Lanza, A. R. Parise, E. L. Moyano, D. M. A. Vera, C. A. Chesta, resultados inéditos b) D. Dusso, C. Ramirez, A. R. Parise, P. A. Lanza, D. M. A. Vera, C. A. Chesta, N. G. Akhmedov, E. L. Moyano. Synthesis of new cyano-substituted analogues of Tröger's bases from bromo-derivatives. A Stereochemical dependence of long-range ($^nJ_{HH}$, $n = 4, 5, \text{ and } 6$) proton-proton and proton-carbon ($^nJ_{CH}$, $n = 1, 2, 3, 4, \text{ and } 5$) coupling constants of these compounds. **2019**, en trámite de envío a *Eur. J. Org. Chem*
- (14) W. V. Farrar. *Reactions of formaldehyde with aromatic amines.* *J. Appl. Chem.* **1964**, *14*, 389–399.
- (15) R. A. Johnson, R. R. Gorman, R. J. Wnuk, N. J. Crittenden, J. W. Aiken. Troeger's base. An alternate synthesis and a structural analog with thromboxane A2 synthetase inhibitory activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1993**. *36*, 3202–3206.
- (16) D. Didier, B. Tylleman, N. Lambert, C. M.L. Vande Velde, F. Blockhuys, A. Collas, S. Sergeyev. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6252–6262.
- (17) F. C. Cooper, M. W. J. Partridge. *J. Chem. Soc.* **1955**, Part 3, 991–994.
- (18) a) E. C. Wagner. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 1296–1298. b) T. R. Miller, E. C. Wagner. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 832–836.
- (19) Y. Wan, R. Yuan, W. Zhang, Y. Shi, W. Lin, W. Yin, R. Bo, J. Shi, H. Wu. Two isolated intermediates of the Tröger's base: synthesis and mechanism. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 3405–3409.

- (20) C. A. M. Abella, M. Benassi, L. S. Santos, M. N. Eberlin, F. Coelho. The Mechanism of Tröger's Base Formation Probed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 4048–4054.

Parte II

Desarrollo De Nuevos Inhibidores

De Glicoproteína-P Humana

Capítulo 5. Búsqueda de inhibidores de P-gp a partir de extractos de plantas de Argentina.

La modulación de P-gp está ganando cada vez más terreno en el descubrimiento de fármacos debido a la importancia clínica de esta bomba de eflujo debido a su asociación con la MDR.¹ En el grupo de investigación se venían llevando a cabo estudios computacionales sobre la P-gp.²⁻⁹ Simultáneamente, también se venía trabajando en colaboración con el grupo de la Prof. Carpinella (UCC) en varias campañas para encontrar principios activos a partir de plantas de Argentina y determinar su mecanismo de acción sobre dianas terapéuticas relacionadas con cáncer³ y otras patologías.⁴⁻⁵ Durante esta tesis se unió la experiencia de los dos grupos para emprender un proyecto de aislación, determinación de mecanismo de acción, modificación y búsqueda de nuevos líderes que tengan actividad inhibitoria de la P-gp, con efectos tóxicos mucho menores de los inhibidores sintéticos conocidos.⁶⁻⁸ Inicialmente, se analizaron 15 principios bioactivos derivados de plantas obtenidos en el laboratorio de la UCC. Se encontró que el pinoresinol (**1a**, Figura 5.1) mostró la mayor efectividad en el ensayo de reversión, potenciando la citotoxicidad de DOX en células Lucena 1 desde los 7 μM . Cuando se aplicó a 112, 28 y 14 μM , mostró un efecto comparable al del verapamilo a 30 μM al eludir el fenotipo MDR. Cuando se evaluó la combinación del pinoresinol y DOX en la línea celular K562 sensible, no se observó disminución en el valor inhibitorio del fármaco quimioterapéutico y, por lo tanto, se descartó cualquier otra interacción entre estos compuestos diferente de la inhibición de la P-gp.⁸ Tomando como referencia el pinoresinol, el compuesto más activo de los ensayados *in vitro*, se aplicó un protocolo de docking extensivo a fin de ubicar el sitio de unión de este compuesto, compararlo con los de algunos de los inhibidores más potentes conocidos y los sustratos de interés terapéutico, evaluar sus energías relativas de ligado e hipotetizar posibles mecanismos de interacción, que serían luego confirmados por los estudios cinéticos experimentales. En otras palabras, entender por qué inhibe la P-gp humana, cómo lo hace, y cómo podría modificarse para que lo haga aún mejor. Desde el punto de vista práctico, esta información se utilizará para

proponer posibles derivatizaciones sintéticas a fin de obtener inhibidores de aún mejor desempeño que el producto natural. Esta retroalimentación con el grupo experimental conllevará a nuevos estudios experimentales y síntesis o adquisición de sólo aquellos compuestos más prometedores *in silico*.⁷

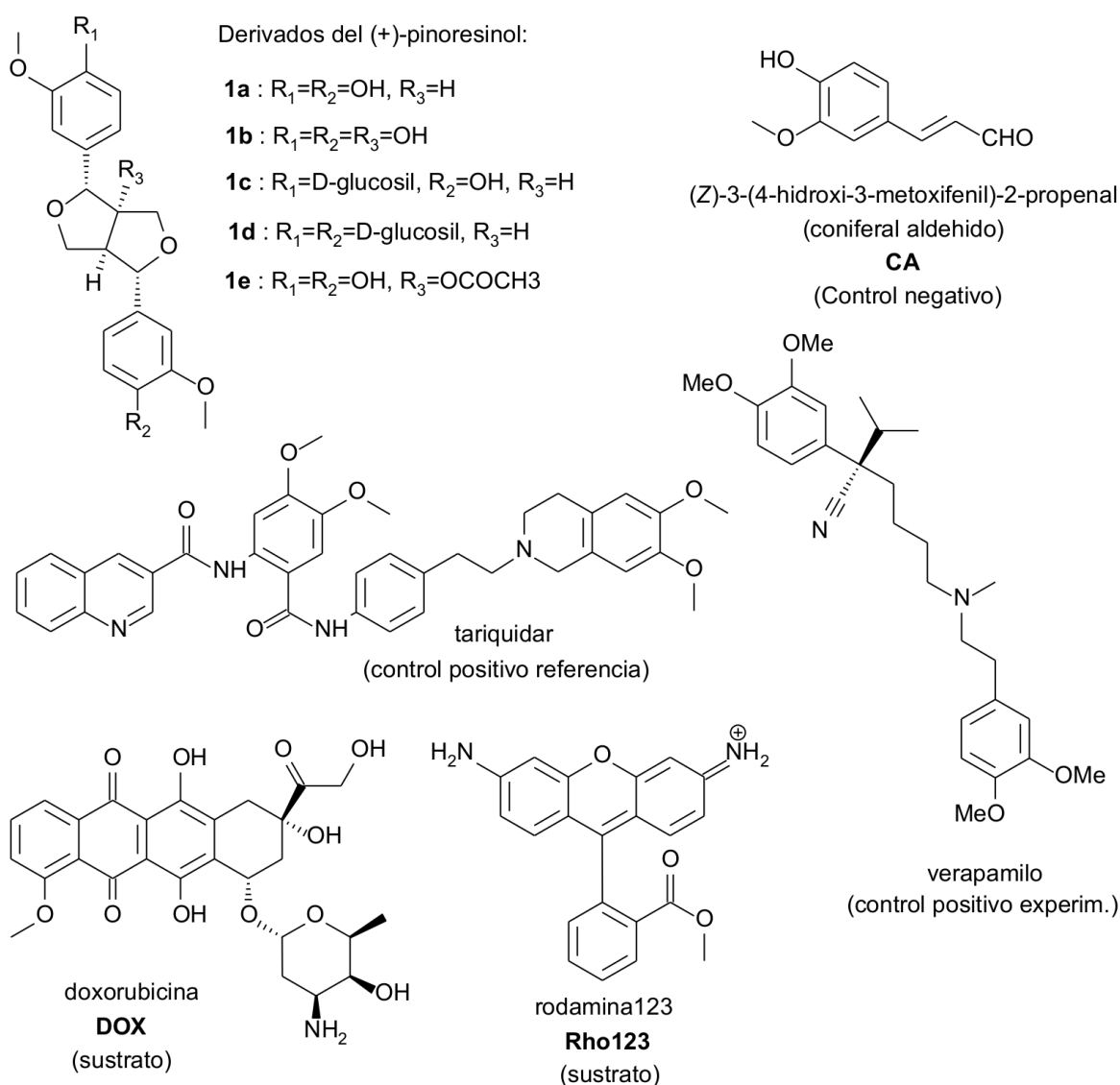


Figura 5.1. Estructuras de (+)-pinoresinol, sus derivados propuestos *in silico*, los compuestos utilizados como controles positivos de referencia. También se muestran las estructuras del control negativo y de dos de los dos compuestos fluorescentes utilizados como sustratos experimentales.

5.1 Análisis del modo de ligado (*binding mode*) del pinoresinol y derivados propuestos.

Mediante docking molecular se determinó que el (+)-pinoresinol (**1a**) se une a la P-gp(h) en el vértice de las hélices transmembrana en forma de una "V" invertida, un sitio propuesto como clave para el reconocimiento del sustrato / inhibidor. Como se ve en la Figura 5.2 donde se detallan los residuos involucrados en la interacción, este ligando se une a los aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos ubicados entre las α -hélices transmembrana (TMH)ⁱ 4, 5 y 6, entre ellos S222, A223, K234, F303, Y307, V310, L339 y F343.

También se analizó el sitio de binding de la región correspondiente a los NBD (*nucleotide binding domain*). Se obtuvieron energías de binding mayores cuando se realizó el docking a partir de grillas que abarcaron sólo los NBD (Figura 5.2). Por ende, se descartó que el mecanismo de acción del pinoresinol y sus derivados esté relacionado con la unión de ATP a los NBD (Figura 5.2c).

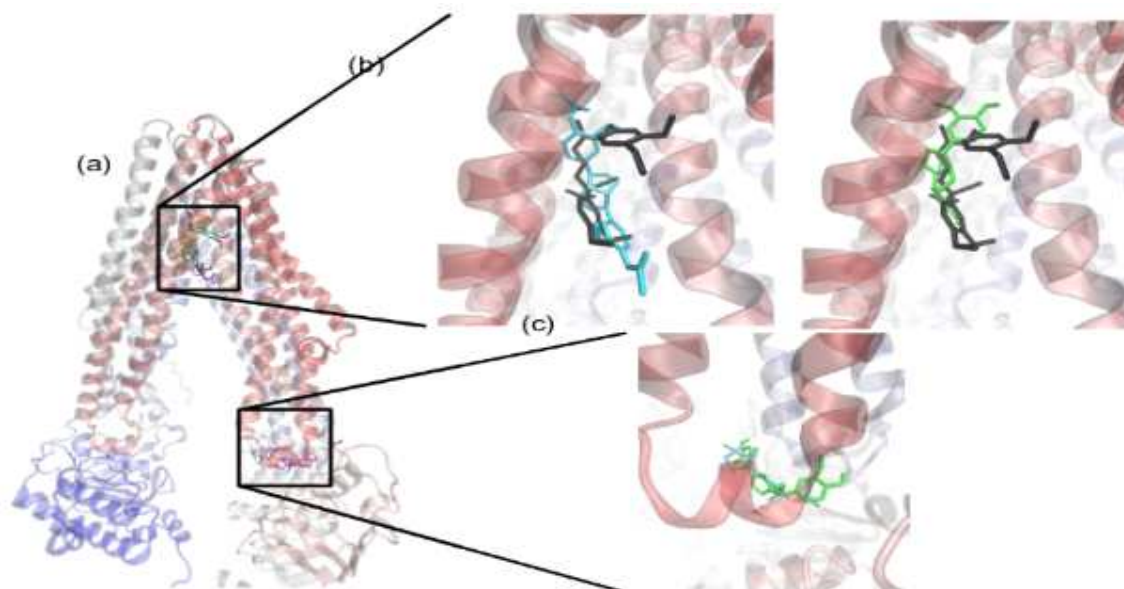


Figura 5.2. Sitios de unión de ligandos al modelo de P-gp(h). En (a) se muestran dos sitios de binding, arriba el sitio transmembrana (b) y abajo el NBD (c). Negro: tariquidar, verde: hidroxí-(+)pinoresinol (**1b**), celeste: acetoxi-(+)pinoresinol (**1e**).

El vértice de las hélices transmembrana formado entre los TMH 4, 5 y 6 también se encontró como sitio de unión para verapamilo y tariquidar. La mayoría de estos residuos se

ⁱ TMH por *trans-membrane helix*.

propusieron como relevantes en la unión de inhibidores sobre bases experimentales y computacionales. Los residuos involucrados en la interacción con el pinosresinol y con sus derivados fueron, en su mayoría, también contactos del tariquidar, por lo que resultan en común acuerdo con los estudios previos.^{9 10 11} Los inhibidores propuestos derivados del pinosresinol se unen a la misma región en el dominio transmembrana. En la Figura 5.3, se sumarian los detalles de las interacciones ligando–P-gp(h) del pinosresinol, el control negativo, los derivados propuestos del pinosresinol y el inhibidor de referencia tariquidar, cuyos contactos se toman como referencia por ser uno de los inhibidores más potentes *in vitro*.

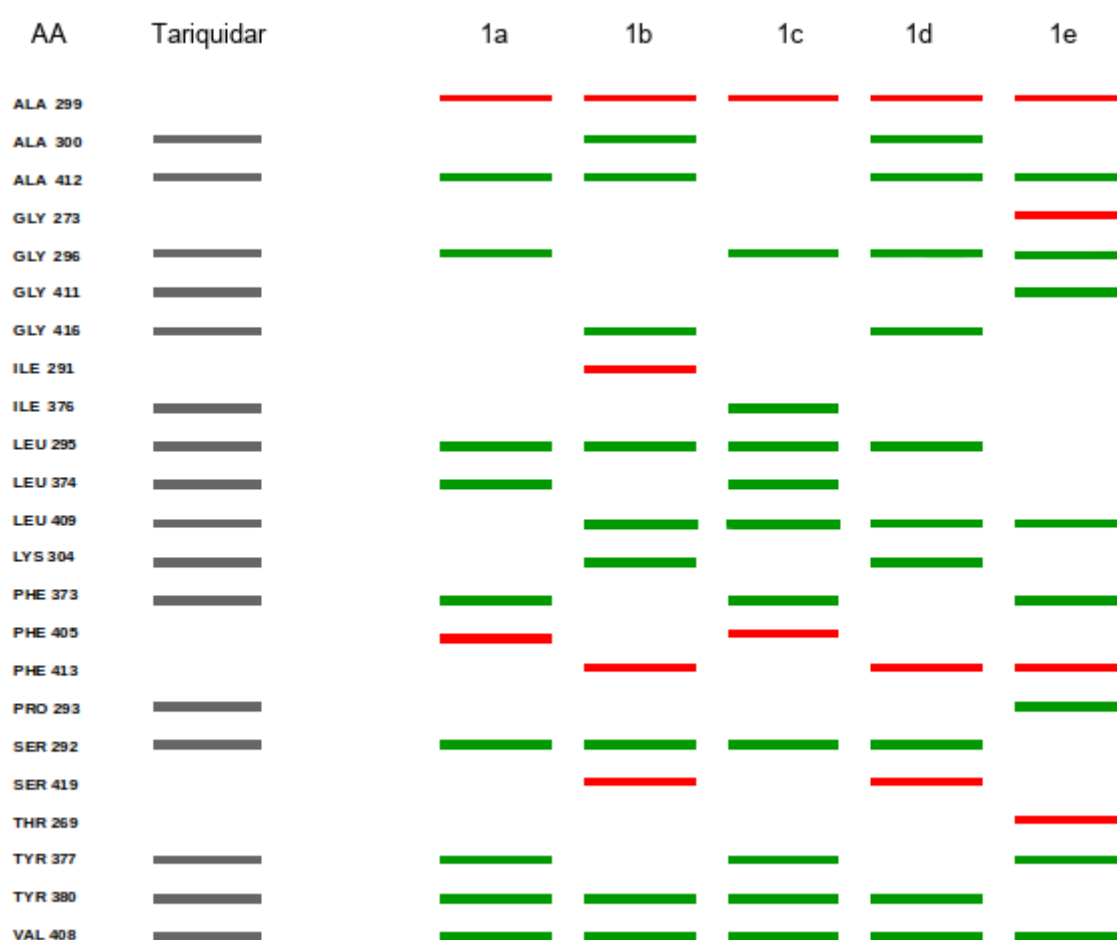


Figura 5.3. Esquema de interacción de los aminoácidos (AA) del modelo de P-gp(h) con los ligandos. Se nombran los aminoácidos en el entorno de los ligandos, tomando como referencia al tariquidar como inhibidor de P-gp(h) (gris). En verde aparecen los residuos compartidos y en rojo los no compartidos con el de referencia. CA: coniferil-aldehído (control negativo). **1a:** (+)pinosresinol. **1b:** hidroxil-(+)pinosresinol. **1c:** glucosil-(+)pinosresinol. **1d:** diglucosil-(+)pinosresinol. **1e:** acetoxil-(+)pinosresinol.

5.1.1 Energías de ligado e interacción molecular P-gp(h)-ligandos

A partir de los resultados de docking molecular, se calcularon las energías libres de *binding* o ligado (ΔG^0_b) y las constantes de inhibición (K_i) de cada uno de los ligandos evaluados en el modelo de P-gp(h). Las mismas se presentan en la Tabla 5.1, siendo $\Delta G^0_b = -RT \ln(K_i)$, donde R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura en °K, y K_i la constante de inhibición. En esta Tabla se observa que, tanto el pinoresinol (**1a**) como todos sus derivados (**1b-f**), tienen energías de unión comparables al verapamilo. En el caso del compuesto 1-acetoxi-pinoresinol (**1e**), la energía resulta aún menor, es decir, más potente que el inhibidor verapamilo de referencia. A su vez, se observa que el CA, seleccionado por ser uno de los compuesto de *Melia azedarach* que no revierte el eflujo de DOX en los ensayos del grupo colaborador y por tanto usado como control negativo, arrojó una constante de inhibición del orden de 150 veces mayor que el promedio de las constantes de inhibición de los inhibidores propuestos, lo cual también está de acuerdo con los resultados experimentales.

Tabla 5.1. Resultados de docking para el modelo de homología humana de P-gp

Compuestos	ΔG^0_b (kcal/mol)	K_i (nM)
Doxorubicina (DOX)	-8.13	1100
Rodamina123	-8.08	1200
Coniferil-aldehído (CA)	-5.66	71580
Verapamilo	-9.01	249
Tariquidar	-12.36	0.32
(+)-pinoresinol (1a)	-8.69	428.1
1-hydroxy-(+)-pinoresinol (1b)	-8.59	505
4-glucosil-(+) pinoresinol (1c)	-8.55	540
(+)-pinoresinol diglucósido (1d)	-8.26	881
1-acetoxi-(+)-pinoresinol (1e)	-9.17	191
Filigenina (1f)	-8.84	338
1-acetoxi-(-)-pinoresinol (1g)	-8.72	402
(-)-pinoresinol (1h)	-8.19	987.9

5.2 Reversión del eflujo de DOX y citotoxicidad

En virtud de los resultados de docking, se decidió obtener, caracterizar y medir la actividad del derivado 1-acetoxi-(+)pinoresinol (**1e**), el más prometedor en virtud de su ΔG^0_b .

En la Tabla 2 se observa la capacidad de revertir el efecto de resistencia a la doxorubicina en células K562 y Lucena 1. La relación entre la concentración (en μM) de los inhibidores, y el factor de reversión (RF, relación entre la IC_{50} de DOX en presencia y en ausencia del inhibidor), indica que a menor concentración de inhibidor requerido para que la RF sea significativa, este será mejor inhibidor.^{6,8}

Tabla 5.2. Efecto de reversión de MDR al agregar distintas concentraciones de inhibidores a cultivos celulares de Lucena 1 (sobrexpresada P-gp) y a K562 (P-gp silenciada, como control de que no actúa sobre otro mecanismo).

Compuesto (concentración $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$)	RF ^(a)	
	K562 ^(b)	Lucena 1 ^(c)
1a (40/112)	1.11 ± 0.15	9.42 ± 4.92
(20/56)	-	2.57 ± 0.20
(10/28)	-	3.44 ± 0.86
(5/14)	-	1.90* ± 0.28
(2.5/7)	-	1.61 ± 0.18
(1.25/3.5)	-	0.92 ± 0.02
1e (12/28)	17.26 ± 3.17	96.79 ± 4.60
(6/14)	1.05 ± 0.14	22.66 ± 2.68
(3/7)	-	5.54 ± 0.59
(1.5/3.5)	-	3.49 ± 0.27
(0.75 /1.75)	-	3.16 ± 0.48
(0.37/0.87)	-	1.90 ± 0.21
(0.18/0.43)	-	1.37 ± 0.05
(0.09/0.21)	-	1.37 ± 0.14
(0.04/0.11)	-	1.42 ± 0.14
(0.02/0.055)	-	0.79 ± 0.04
Verapamilo (15/30)	1.24 ± 0.49	13.88 ± 4.79
(0.054/0.11)	-	1.34 ± 0.06
(0.027/0.055)	-	1.17 ± 0.17

a) RF calculados como (IC_{50} de la DOX) / (IC_{50} de la DOX en presencia de los compuestos estudiados) para cada concentración del inhibidor.⁸

En los resultados obtenidos por el grupo colaborador de la UCC se observó que el pinoresinol en una concentración de 28 μM , produce un factor 3.4 de aumento a la sensibilidad por DOX en células de Lucena 1. También se puede observar que el 1-acetoxi-pinoresinol actúa revirtiendo la resistencia a DOX a concentraciones considerablemente bajas, de 0.11 μM , aún mejor que el verapamilo (Figuras 5.4 y 5.5).

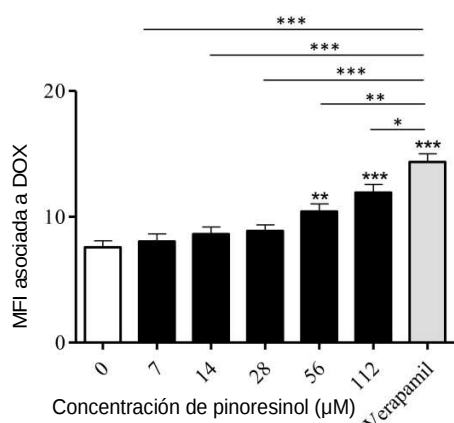


Figura 5.4. Efecto de una serie de concentración de pinoresinol (**1a**) sobre el flujo de salida de DOX en células Lucena 1. Los puntos de datos representan la media \pm SE. Las diferencias significativas con respecto al control se determinaron utilizando la prueba t de Student de una cola no pareada (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).⁸

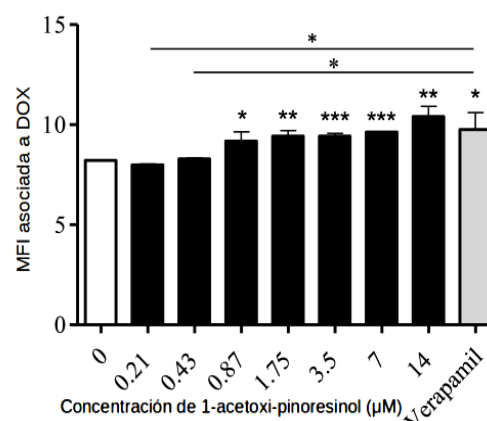


Figura 5.5. Efecto de una serie de concentración de **1e** sobre el flujo de salida de DOX en células Lucena 1. Los puntos de datos representan la media \pm SE. Las diferencias significativas con respecto al control se determinaron utilizando la prueba t de Student de una cola no pareada (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).⁸

La ausencia del aumento en la acumulación de DOX en células K562 indicó que **1e** también bloquea específicamente el flujo de salida mediado por P-gp(h).⁸

Los ensayos de citotoxicidad para pinoresinol y para 1-acetoxi-pinoresinol (ensayo PBMC o de células mononucleares de sangre periférica) dieron un IC 50 de 216.2 y 102.6 μM respectivamente. Esto sugirió la ausencia de citotoxicidad, basada en la declaración del programa de detección de plantas del Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. que estableció como citotóxicos aquellos compuestos puros con valores de toxicidad promedio inferiores a 10 μM .¹² Estos resultados no son sorprendentes, puesto que **1a** se encuentra en otras fuentes naturales de la dieta;¹³ incluso **1e**, si bien el usado en los experimentos es de origen sintético, se encuentra en cantidades importantes en el aceite de oliva virgen.¹⁴

5.3 Cinética de inhibición

Con respecto a los estudios cinéticos,⁸ en la Figura 5.6 se muestra que el mecanismo de inhibición del pinosresinol es competitivo, dado que los valores de MFI permanecen constantes, mientras que la constante de Michaelis-Menten (K_m) aumenta, como se observa en la familia de líneas rectas que pasan por el mismo punto del eje vertical.

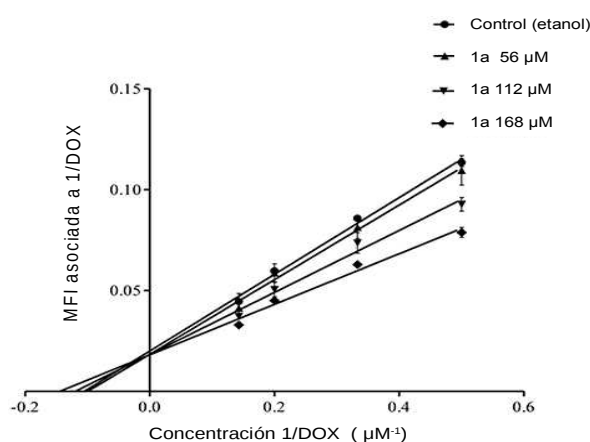


Figura 5.6 Gráfico de doble recíprocas de Lineweaver-Burk para el análisis cinético del pinosresinol.⁸

Estos resultados experimentales son consistentes con las poses del (+)-pinosresinol y el compuesto seleccionado a partir de los estudios de docking como candidato a ser más activo, **1e**. En la Figura 5.7 se muestra la superposición del sitio de unión primario de la DOX en la P-gp, y de **1a**, lo que evidencia, en principio, un mecanismo de acción competitivo para la extrusión del antitumoral. En la Fig. 5.7 se observa que el pinosresinol (al igual que sus derivados) también se superpone con el sitio secundario de Rho123. En los experimentos se notó una diferencia pequeña aunque no casual entre la inhibición del eflujo de DOX y Rho123, con un factor de entre 1.2 y 1.8 a favor de DOX.⁸ Estas discrepancias fueron observadas también en otros estudios experimentales.¹⁵ Aunque la ubicación de los sitios y el modo de ligado de los dos sustratos tienen algunas diferencias menores (el sitio de unión primario de DOX coincidió con uno secundario, 0.4 kcal/mol menos estable, de la Rho123), el uso de nuevos controles positivos arrojará luz sobre la equivalencia del eflujo de DOX (un fármaco) versus Rho123 (un colorante sin propiedades antitumorales). Estos resultados se discutirán en el capítulo siguiente.

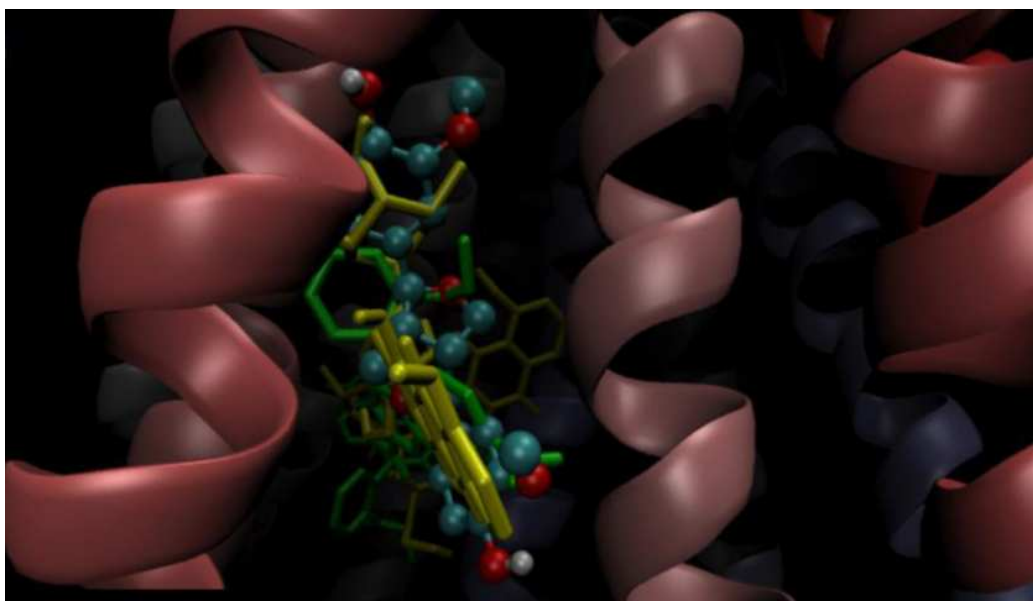


Figura 5.7. Superposición de las poses de menor energía del compuesto **1a** representado en CPK. El sitio primario de la DOX aparece en primer plano en tubos verdes. El sitio secundario de la Rho123 en primer plano en tubos amarillos. Atrás (segundo plano), sitio primario de Rho123. Las α -hélices del modelo de P-gp(h), coloreadas de acuerdo a la secuencia.

5.4 Conclusiones

Mediante el docking molecular se logró caracterizar el modo de ligado del pinosresinol y compararlo con los inhibidores de referencia, encontrándose que emula, en parte, el modo de uno de los más potentes tomado como referencia.

Con los ensayos experimentales realizados por la UCC se evidenció que el pinosresinol fue efectivo para retener DOX en las células Lucena 1 desde el comienzo del ensayo, lo que sugiere que el tratamiento a corto plazo con el modulador conduciría a la efectividad. El comportamiento de la cinética de la acumulación de DOX fue analizado por el método doble recíprocas de Lineweaver-Burk, mostrando que el pinosresinol es un inhibidor competitivo de la P-gp(h), lo que resultó consistente con la superposición de los modos de ligado con la DOX.

Gracias al diseño racional, se probaron *in silico* los posibles derivados sintéticos del pinosresinol, logrando predecir una mejora en cuanto a las constantes de inhibición. El mejor de los compuestos propuestos, el derivado 1-acetoxi-pinosresinol (**1e**), fue en efecto probado luego *in*

vitro, y su actividad mejoró notablemente (64 veces mayor), incluso algo más de lo predicho a partir de los cálculos. También evidenció un comportamiento competitivo.

Se concluye que el pinoresinol y su derivado **1e** son quimiosensibilizadores de P-gp(h). Esta propiedad, la baja citotoxicidad demostrada y su presencia en alimentos de la dieta diaria ¹³ ¹⁴, los posiciona como posibles candidatos para el desarrollo de compuestos de uso en combinación con fármacos anticancerosos.

Debido a que una mínima modificación en los grupos sustituyentes del pinoresinol cambia la cantidad de enlaces rotables, el potencial electrostático de la molécula y, por tanto, la interacción ligando-aminoácidos y las constantes de inhibición calculadas, se decide ampliar la búsqueda en pos de moduladores efectivos, utilizando bases de datos de compuestos no tóxicos y una quimioteca de compuestos.

- (1) Véase Cap. 1 sección 5 y referencias allí citadas.
- (2) G. E. Jara, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba, **2012**.
- (3) M. E. Chiari, D. M. A. Vera, S. M. Palacios, M. C. Carpinella. Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3474–3482.
- (4) M. E. Chiari, L. Tosoni, M. B. Joray, G. N. Diaz-Napal, G. M. Ruiz, S. M. Palacios, D. M. A. Vera, M. C. Carpinella. The Inhibitory Activity of Plants from Central Argentina on p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. Isolation and Mechanism of Inhibition of a Flavanone from *Flourensia oolepis*. *Planta Med.*, **2015**, *81*, 1382-1391.
- (5) M. I. Crespo, M. Funes-Chabán, P. A. Lanza, M. B. Joray, S. M. Palacios, D. M. A. Vera, M. C. Carpinella. Inhibitory effects of compounds isolated from *Lepechinia meyenii* on tyrosinase. *Food and Chemical Toxicology*, **2019**, *125*, 383-391.
- (6) S. N. Gancedo, P. A. Lanza-Castronuovo, G. E. Jara, M.-L. González, M.-C. Carpinella. D. M. A. Vera. Binding of pinoresinol derivatives to P-glycoprotein. A computational Study. CLAFQO-13 (13th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry) , **2015**, Carlos Paz, Argentina. #P53
- (7) J. Laiolo, T. Tomašič, D. M. A. Vera, M. L. González, P. A. Lanza, S. N. Gancedo, Ž. Hodnik, L. P. Mašič, D. Kikelj, M.-C. Carpinella. Analogs of the lignan pinoresinol as novel P-glycoprotein (P-gp) inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2018**, En Prensa: ml-2018-00324t.
- (8) M. L. González, D. M. A. Vera, J. Laiolo, M. B. Joray, M. Maccioni, S. M. Palacios, P. A. Lanza, S. Gancedo, V. Rumjanek, M. C. Carpinella. Mechanism underlying the reversal of drug resistance in P-glycoprotein-expressing leukemia cells by pinoresinol and the study of a derivative. *Frontiers in Pharmacology* **2017**, *8*, 205.
- (9) G. E. Jara, D. M. A. Vera, A. B. Pierini. Binding of Modulators to Mouse and Human Multidrug Resistance P-glycoprotein. A Computational Study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2013**, *46*, 10–21.
- (10) Véase ref. 9 y la extensa bibliografía allí citada.
- (11) X. Q. Li, L. Wang, Y. Lei, T. Hu, F. L. Zhang, C. H. Cho, *et al.*. Reversal of P-gp and BCRP-mediated MDR by tariquidar derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *101*, 560–572.
- (12) V. Kuete, P. Ango, S. Yeboah, A. Mbaveng, R. Mapitse, G. Kapche *et al.* Cytotoxicity of four *Aframomum* species (*A. albobviolaceum*, *A. kayserianum* and *A. polyanthum*) towards multi-factorial drug resistant cancer cell lines. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 340.
- (13) L. Fini, E. Hotchkiss, V. Fogliano, G. Graziani, M. Romano, B. Edward *et al.* Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 139–146.
- (14) A. López-Biedma, C. Sánchez-Quesada, M. Delgado-Rodríguez, J. J. Gaforio. The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oils: a review. *J. Funct. Foods*, **2016**, *26*, 36–47.

- (15) A. B. Shapiro, V. Ling. Positively cooperative sites for drug transport by p-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130–137.

Capítulo 6. Diseño y ensayo de nuevos inhibidores de la P-gp

El éxito de los productos derivados de plantas como puntos de partida para el desarrollo de fármacos^{1 2} llevaron a la búsqueda de candidatos adecuados con actividad mejorada en comparación con el (\pm)-pinoresinol para contrarrestar específicamente el mecanismo de resistencia de fármacos en células con sobreexpresión de P-gp.³ En el capítulo anterior vimos que aún una derivatización relativamente sencilla de este núcleo lignano del (+)-pinoresinol (en este capítulo, compuesto **1**) rindió un aumento considerable de la actividad. En este capítulo se describe una búsqueda sistemática de nuevos inhibidores, tratando de probar compuestos con similitud química con **1** y consolidando el grupo de colaboradores con la experiencia del Prof. Kikelj (Universidad de Ljubljana, Eslovenia) en la síntesis y ensayos de fármacos. Además de las facilidades sintéticas, en comunicaciones preliminares encontramos semejanzas entre alguno de sus ligandos del PXR (*pregnane-X-receptor*),⁴ entre ellas distancias próximas a 13 Å entre los grupos -OH fenólicos separados por bicíclicos o ciclos condensados hidrofóbicos entre ellos. Estas similitudes, además del hecho de que los antagonistas de PXR ya tienen aplicación en tratamientos antitumorales *per se*, en diferentes blancos y además, en particular, previenen la sobreexpresión de P-gp (los agonistas regulan positivamente el nivel de expresión de P-gp),^{7 5 6} alentaron incluir esta quimioteca en la búsqueda de inhibidores con similitudes a **1**. En particular se extendió la búsqueda a la biblioteca de drogas (drug-likes) ZINC DrugsNow (<http://zinc.docking.org/subsets/drugs-now>) y derivados sintéticos a analizar *in silico* de la quimioteca de derivados del dietilestilbestrol.

6.1 Screening de análogos del pinoresinol

El screening se realizó a partir de una quimioteca de ligandos a receptores X de pregnano (PXR), que poseen una estructura similar al compuesto **1**,⁷ y de la biblioteca ZINC DrugsNow,⁸ que contiene más de 10 millones de compuestos. Para ello se empleó el programa ROCS.^{9,10} Se

calculó el índice de similitud estructural de Tanimoto-Combo, que combina las medidas de similitud estructural e índice de color de un compuesto (una superposición apropiada de grupos con propiedades similares según contenga grupos donante, aceptor, hidrófobo, catión, anión y/o anillo).^{11 12}

ROCS demostró que las moléculas de ZINC identificadas **10-25** (Figura 6.1) se superponen mejor con el pinosresinol (TanimotoCombo entre 1.413 y 1.606) que con los antagonistas de PXR basados en la estructura de bazedoxifeno (**2-6**) y del dietilstilbestrol (**7-9**) basado en ligandos de PXR, además de otras modificaciones sintéticas accesibles **26-34** (Figura 6.2 , TanimotoCombo entre 0.823 y 0.851).

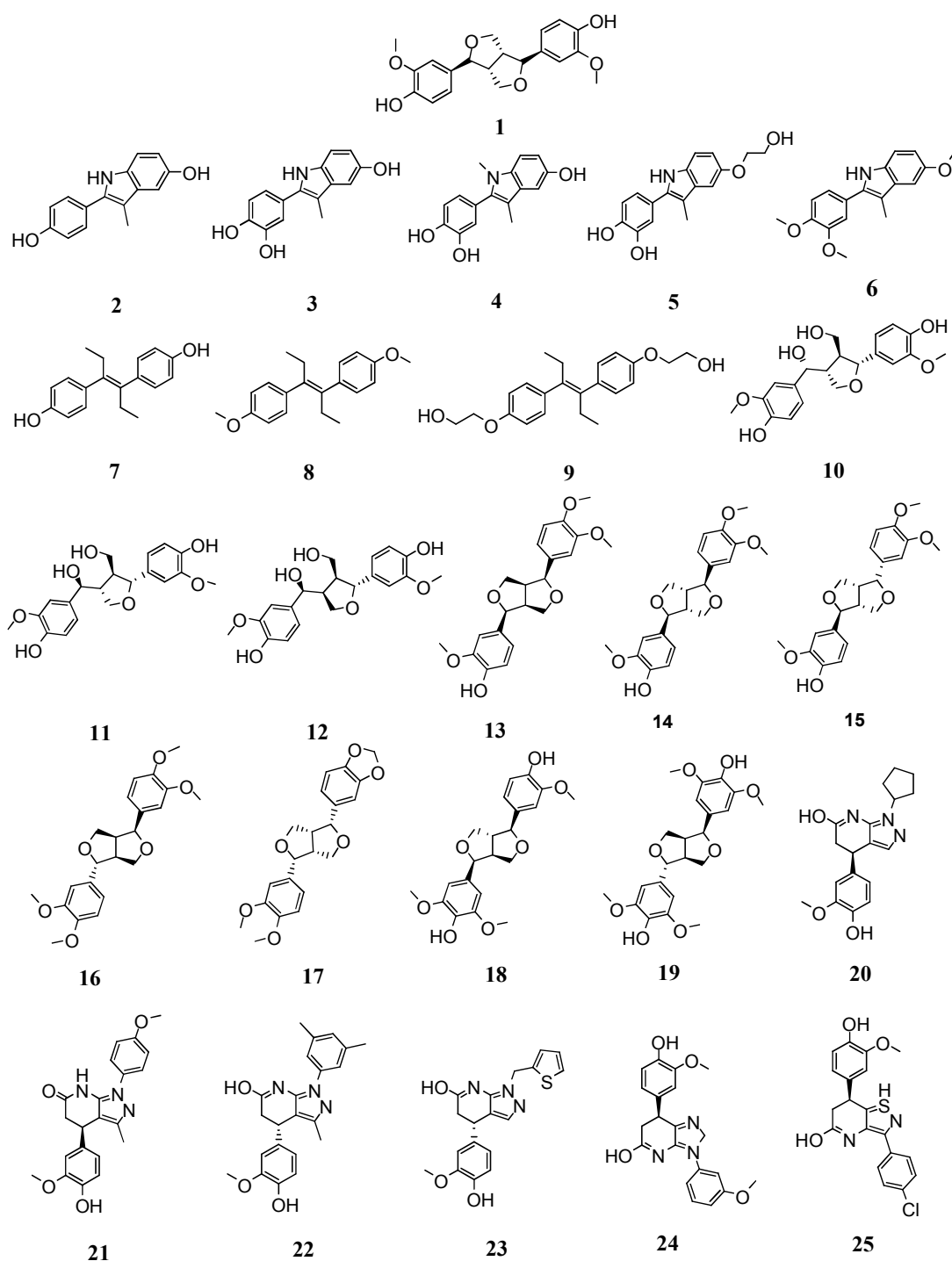


Figura 6.1. Las estructuras químicas de (+)-pinoresinol (1), los ligandos PXR 2-9 y los compuestos ZINC 10-25 de máxima similitud con el compuesto 1 a partir de la búsqueda con ROCS.

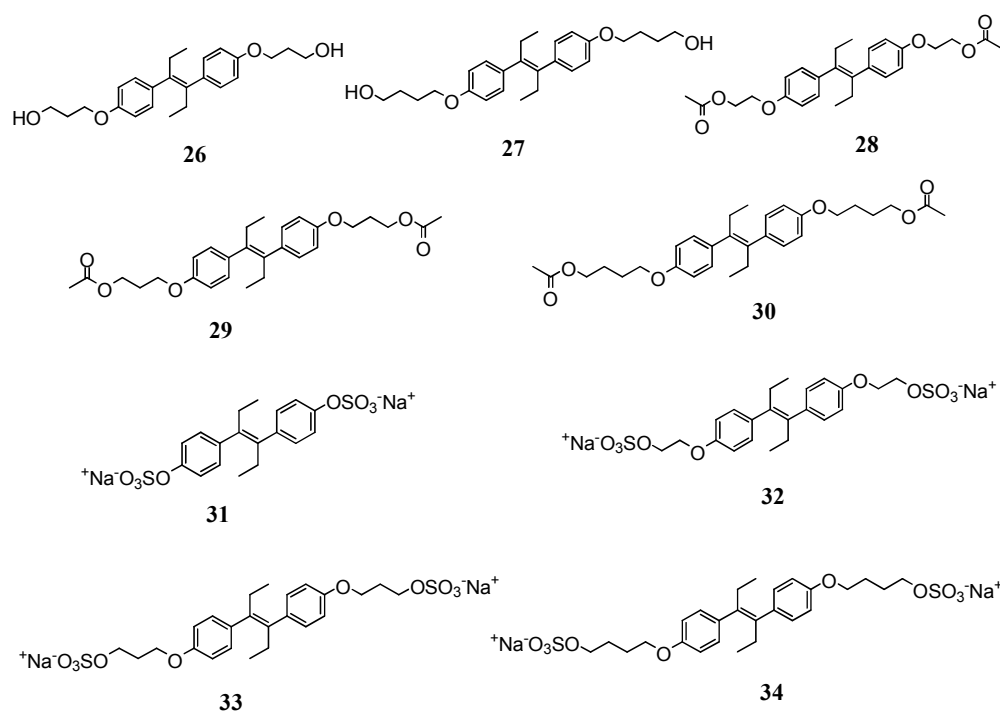


Figura 6.2. Estructuras químicas de los derivados del dietilestilbestrol: 26-34. Estos compuestos, aunque con índices TamimotoCombo algo menores que 7-9, estaban sintetizados por el grupo colaborador y completan la familia de antagonistas de PXR.

6.2 Docking de los compuestos en la P-gp

Sobre la base de estos resultados, las estructuras optimizadas de estos compuestos se estudiaron *in silico* mediante docking molecular, utilizando el modelo de homología humana de P-gp previamente construido en base a la P-gp de ratón (*Mus musculus*)¹³ siguiendo el protocolo general usado en el Cap. 5 y descrito en el Cap 2 (secc. 2.3). En casos relevantes, se investigaron ambos estereoisómeros (+/-) y los tautómeros NH y OH (formas ceto y enol) para los compuestos 20-25. Como se observa en la Tabla 6.1, los compuestos evaluados mostraron energías de unión que varían de -7.07 a -9.23 kcal/mol. Se utilizaron los controles negativos y positivos del capítulo anterior (se omiten detalles); además se incluyeron dos nuevos controles positivos experimentales que, como se verá más adelante, sirvieron para dilucidar discrepancias entre los eflujos de Rho123 y DOX, ya observadas en el capítulo anterior: el tamoxifeno y la ciclosporina A (CsA) (Figura 6.3).

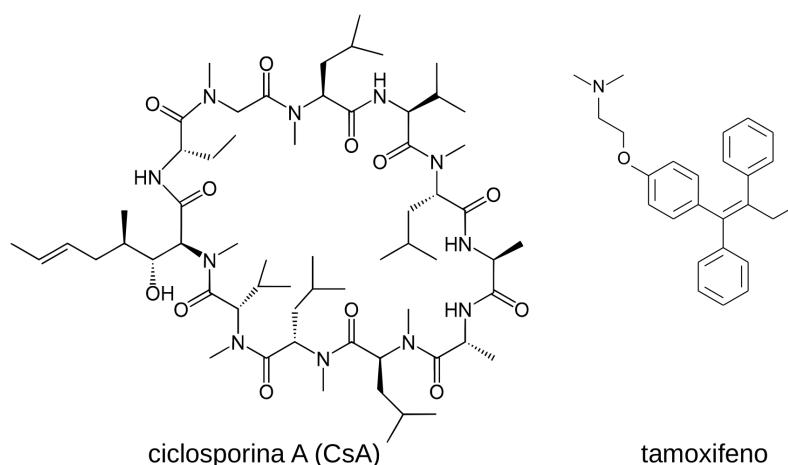


Figura 6.3. Estructura de la ciclosporina A y el tamoxifeno, empleados como controles positivos adicionales para analizar diferencias entre el eflujo de Rho123 y DOX.

Entre los compuestos **2-9** conocidos como potentes antagonistas de PXR, como así también similares a **1**, se encontró que **9** es el más potente (observándose decrecimiento en la acumulación de DOX con contracciones tan bajas como $3.12 \mu\text{M}$ en la línea Lucena 1, sin efecto en el control K562), seguido por **8** y **7**, en buen acuerdo con los resultados de docking. No obstante si bien su energía es muy similar a **1**, se encontró mayor actividad en la acumulación de DOX, lo que podría ser una combinación de inhibición de la P-gp y también represión de su expresión via modulación del PXR.¹⁷ De los compuestos de la serie propuestos sólo por máxima similitud **10-25**, se postularon como los más favorecidos a **14**, **19** y **23**. En primera instancia, sólo resultó posible obtener **23** (uno de los más activos *in silico*), aunque éste no resultó más potente que el pinoresinol. De los compuestos propuestos tanto como inhibidores de P-gp como antagonistas del regulador PXR se descartaron **31-34** por su doble carga negativa (aunque se comprobó preliminarmente que carecían de actividad medible), pero los compuestos neutros **26-30** resultaron los mejores de la serie, particularmente **27**, con disminución de la acumulación de DOX hasta concentraciones menores a $0.4 \mu\text{M}$. Nuevamente, **27** sólo es ligeramente mejor que **1**, en términos de energías de ligado, pero su mayor potencia puede explicarse tanto por la combinación con la disminución de la expresión de P-gp (máxima actividad como antagonista de PXR, que estimula la expresión de P-gp), como por algunas diferencia en el modo de ligado.

Tabla 6.1. Resumen de energías libres de ligado para el panel de compuestos propuestos *in silico*.

Compuestos	ΔG^0_b (kcal/mol)	Constante de inhibición, K_i (nM)
1 (-)	-8.19	987.9
1 (+)	-8.69	428.1
2	-7.45	3460
3	-7.46	3380
4	-7.07	6570
5	-8.22	945.7
6	-8.00	1380
7	-8.38	725.2
8	-8.31	811.0
9	-8.50	591.0
10	-8.01	1350
11	-8.14	1080
12	-7.87	1710
13	-8.95	279.2
14	-9.10	214.7
15	-9.09	216.0
16	-8.78	366.5
17	-9.23	172.9
18	-8.63	475.9
19	-7.89	1633
20 (NH)	-8.59	505.9
20 (OH)	-8.29	803.5
21 (NH)	-8.32	800.8
21 (OH)	-8.56	528.7
22 (NH)	-9.04	237.4
22 (OH)	-9.16	193.0
23 (NH)	-9.23	172.6
23 (OH)	-8.85	325.2
24 (NH)	-8.63	476.0
24 (OH)	-8.92	291.1
25 (OH)	-9.05	242.7
25 (NH)	-8.80	354.3
26	-8.52	566.4

27	-8.66	449.9
28	-8.50	584.1
29	-8.71	413.0
30	-9.12	207.6
Tariquidar	-12.36	0.320
Verapamil	-9.07	225.5
Tamoxifeno	-9.40	129.2
CsA	-9.91	54.4
DOX	-8.23	899.7

El modo de ligado de **1** se describió en detalle en el Capítulo 5, con su principales contactos involucrando los residuos S222, A223, K234, F303, Y307, Y310, L339, A342 y F343, de los TMHs 4, 5 y 6 en el vértice de la "V" invertida que forman estas α -hélices. Como se señaló, todos estos residuos han sido extensamente propuestos como esenciales para el binding, tanto por estudios experimentales (mutagénesis, *cross-linking* de cisteínas) y ensayos computacionales propios del grupo y de otros autores (Cap. 5 y referencias allí citadas). Los inhibidores **7-9** y **26-30**, los cuales fueron activos para promover la potenciación de DOX (experimentos de reversión) e inhibición de su eflujo (acumulación de DOX) se superpusieron con el sitio principal de su predecesor **1** (vista general de la posición de los confómeros de menor energía superpuestos, Figura 6.4), el cual a su vez coincidió en parte con el inhibidor más potente de referencia, el tariquidar.

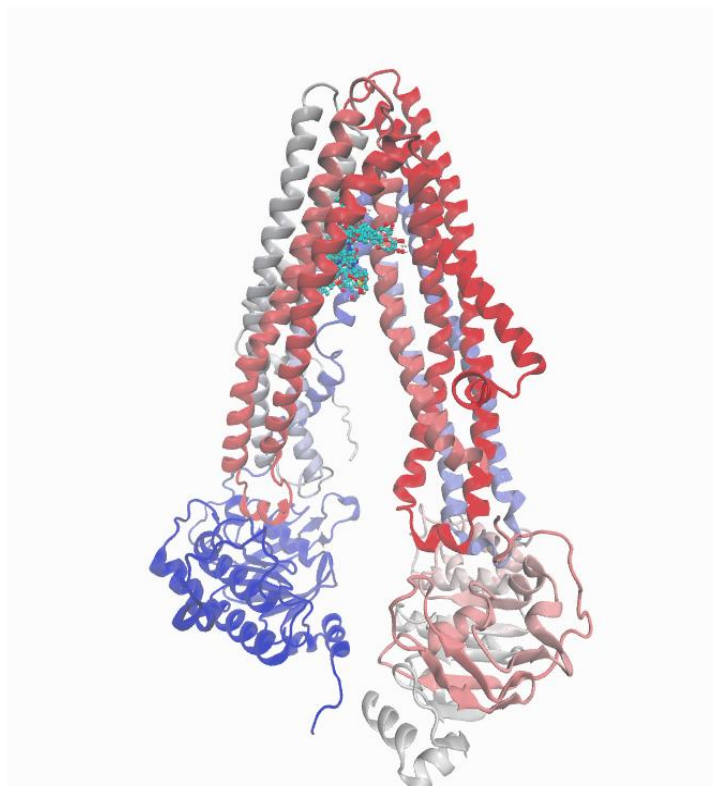


Figura 6.4. Superposición de los ligandos análogos de pinoresinol en su conformero de menor energía de binding (sitio de unión compartido en la P-gp).

Los compuestos más activos, **26**, **27** y **30**, son los que mostraron máxima superposición con la pose del tariquidar. En particular **27** fue el único de toda la serie que además de los TMHs mencionados tomó contacto con el TMH 3, con los residuos (comunes al tariquidar) T199, F200 y G203. La superposición de **1**, **26** y **27** con el tariquidar se muestra en la Figura 6.5A y los principales residuos en contacto se destacan en la Figura 6.5B. También se puede apreciar la orientación del compuesto **27** en su conformero de menor energía acomodado sobre superficie coloreada por el potencial electrostático del modelo de P-gp (Figura 6.6).

Es interesante destacar que las poses de menor energía de los compuestos que resultaron más activos, **26** y **27**, se localizaron en los dos sitios principales de ligado de DOX, con -8.52 y -8.66 kcal/mol respectivamente (Figura 6.7) y se hallan poses de mayor energía (hasta 1.2 kcal/mol arriba de la más estable) superpuestas con estos sitios.

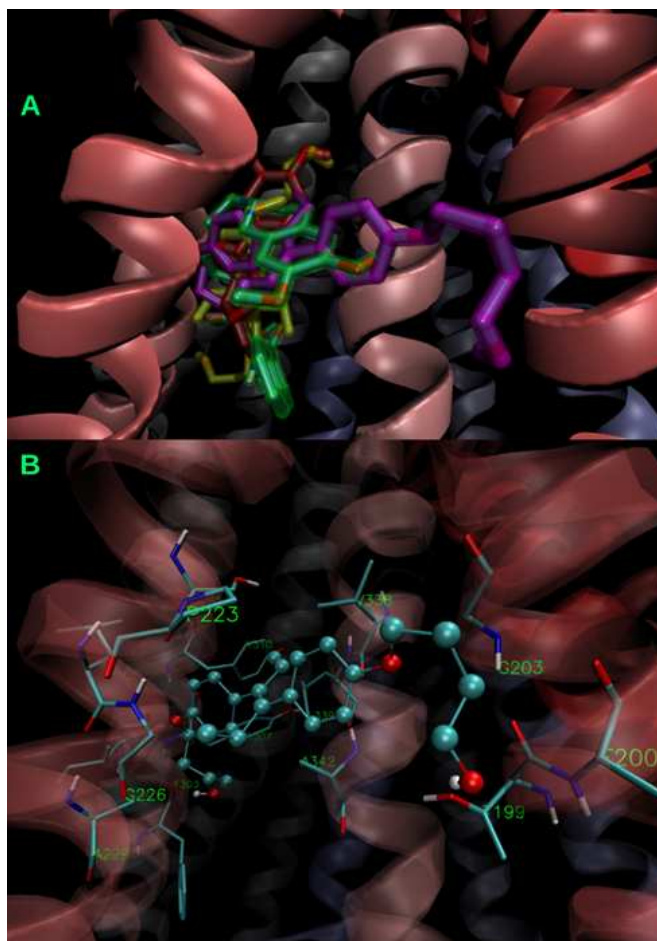


Figura 6.5. A) Superposición de las posturas de menor energía de los inhibidores **1** (resaltado en rojo), **26** (en amarillo), **27** (en violeta) y el inhibidor de referencia tariquidar (en verde). B) Modo de ligado del compuesto más activo **27** (balls and sticks) mostrando sus contactos principales (licorice). La representación en cartoon de las α -hélices se colorea según la secuencia, desde TMH 1 (rojo) a TMH 12 (azul).

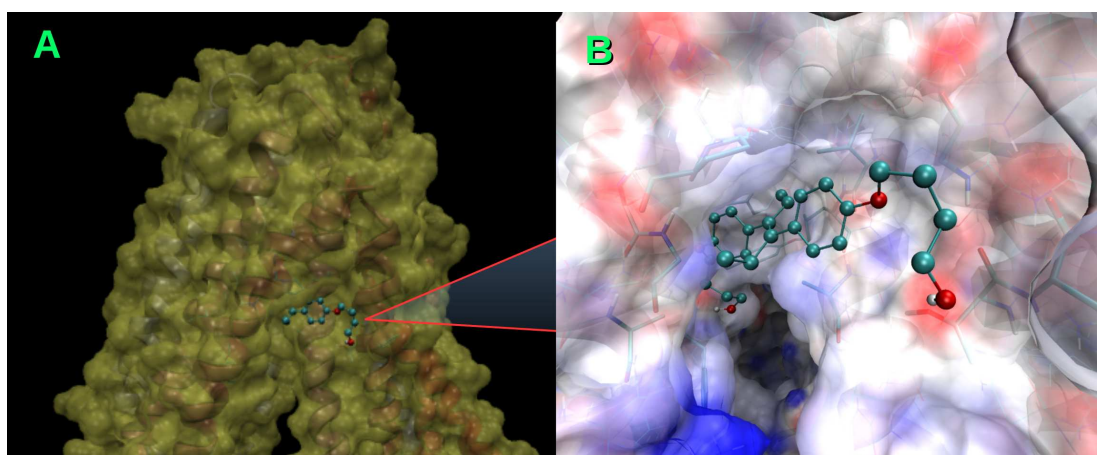


Figura 6.6. A) Localización del sitio de ligado. Compuesto **27** en el modelo de P-gp humana; B) Zoom del sitio, con la superficie de la proteína coloreada según el potencial electrostático (desde -0.15 a. u. rojo, a +0.15 a. u. azul).

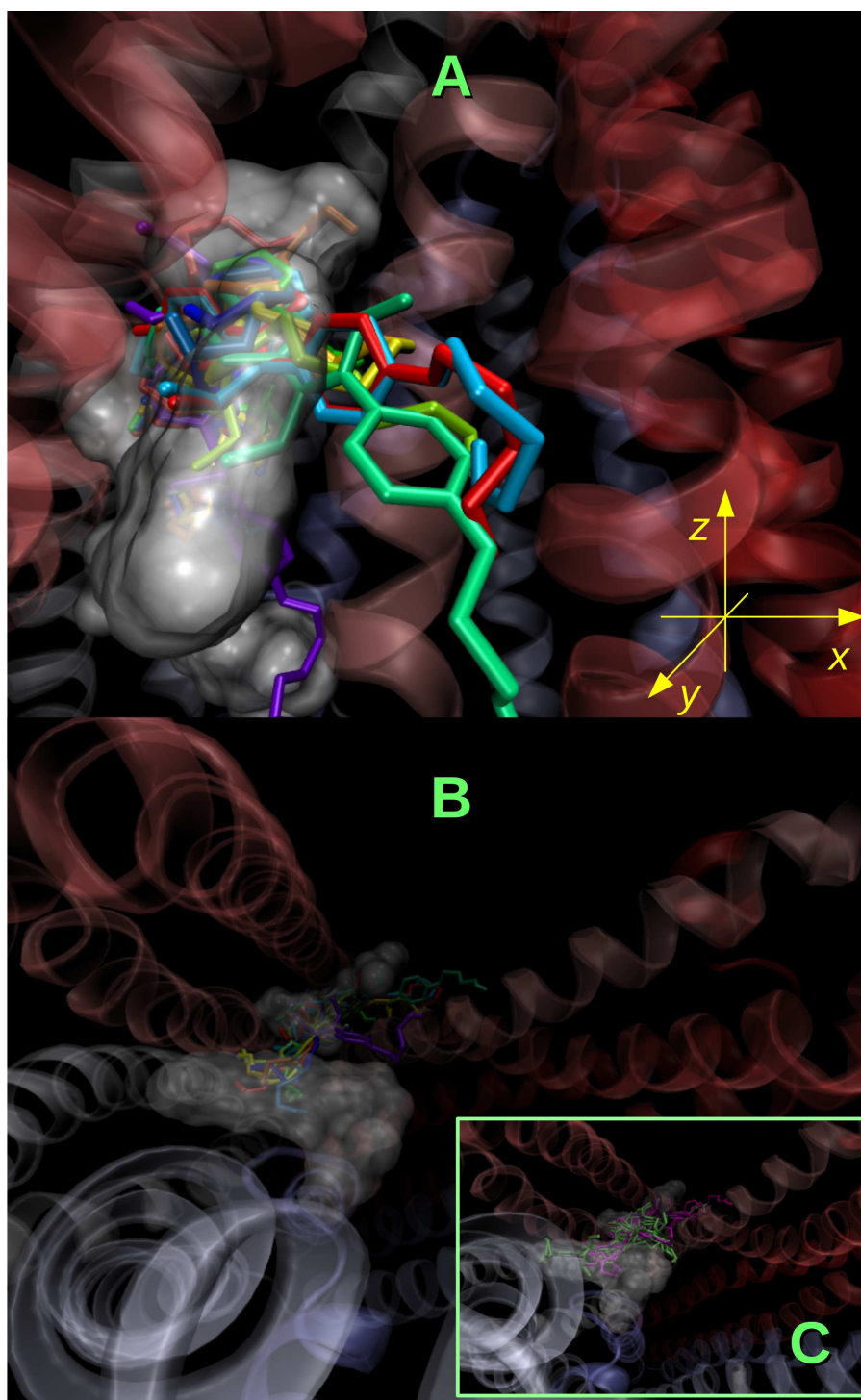


Figura 6.7. A) El espacio ocupado por los sitios principales de DOX (-8.23 Y -8.16 kcal/mol de ΔG^0_b) como superficies translúcidas blancas. La proteína como cartoon con las α -hélices coloreadas según la secuencia, de rojo a azul. Las poses de menor energía del compuesto 27 están superpuestas y coloreadas de acuerdo a sus energías de ligado, arcoiris desde -8.66 (rojo) a -7.44 kcal/mol (violeta). B) La misma vista rotada -90 grados en el eje X. C) Misma vista que en B; las estructuras de 27 todas en magenta superpuestas con las correspondientes poses obtenidas para 26 todas en verde

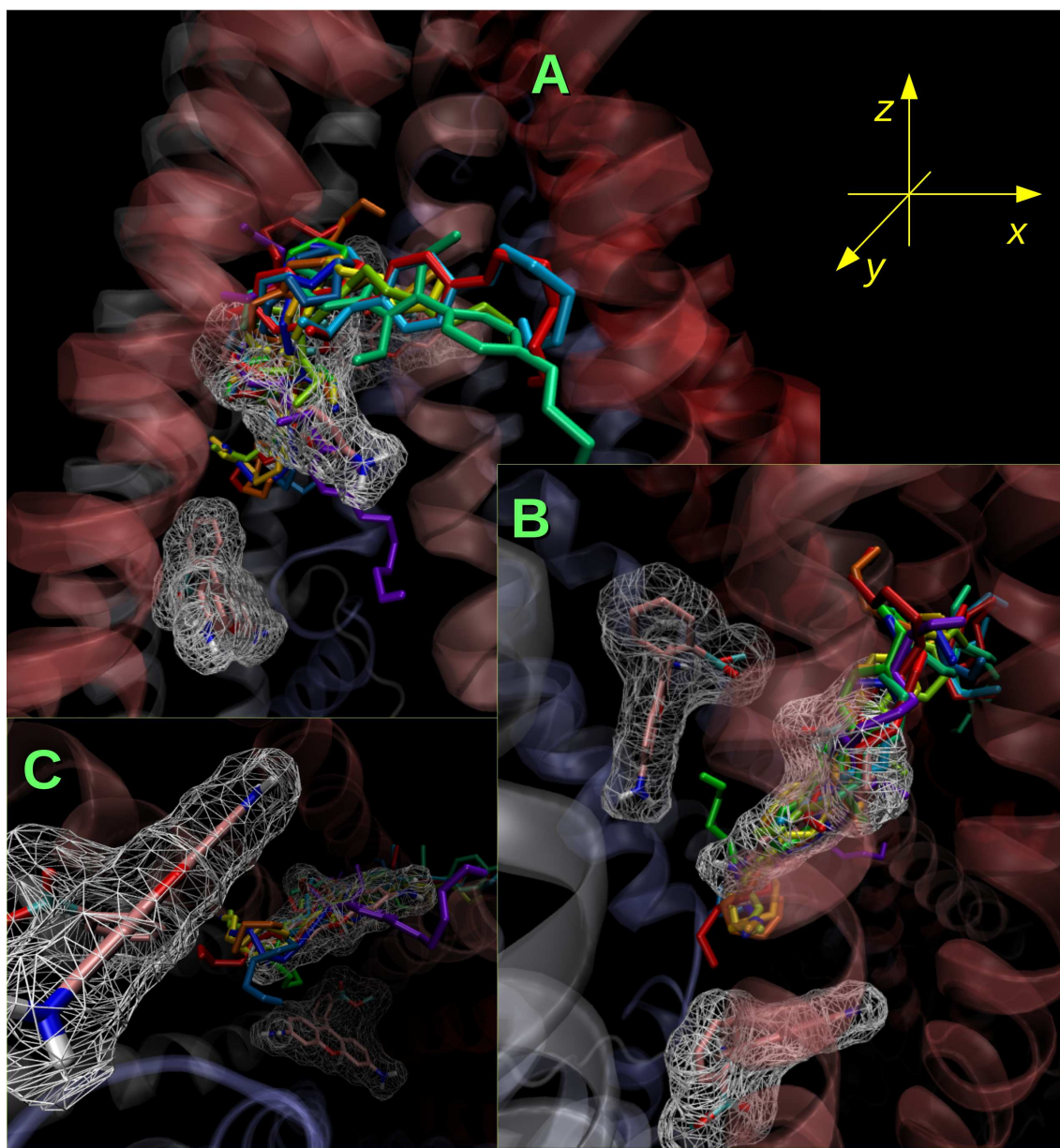


Figura 6.8. . A) Superposición de las primeras poses de menor energía de 27; colores como en la Figura anterior. Principales sitios para Rho123 aparecen en blanco como tejido de alambre. Las poses de 27 sólo solapan con el sitio secundario de Rho123, los otros no son ocluidos. B) Vista rotada -90 grados sobre el eje Z. C) Vista rotada -90 grados sobre el eje X.

Por el contrario, ninguna de estas conformaciones se superpone con el sitio primario ni secundario (difieren 0.3 kcal/mol) de la Rho123, como puede verse en las Figuras 6.8 y 6.9 . Claramente, **26** y **27** (y también **1** e incluso el control tamoxifeno) son incapaces de inhibir competitivamente la P-gp cuando el sustrato es DOX para el caso de Rho123. O bien siguen un proceso no competitivo menos eficiente o no tienen efecto relevante en evitar el ligado de Rho123.

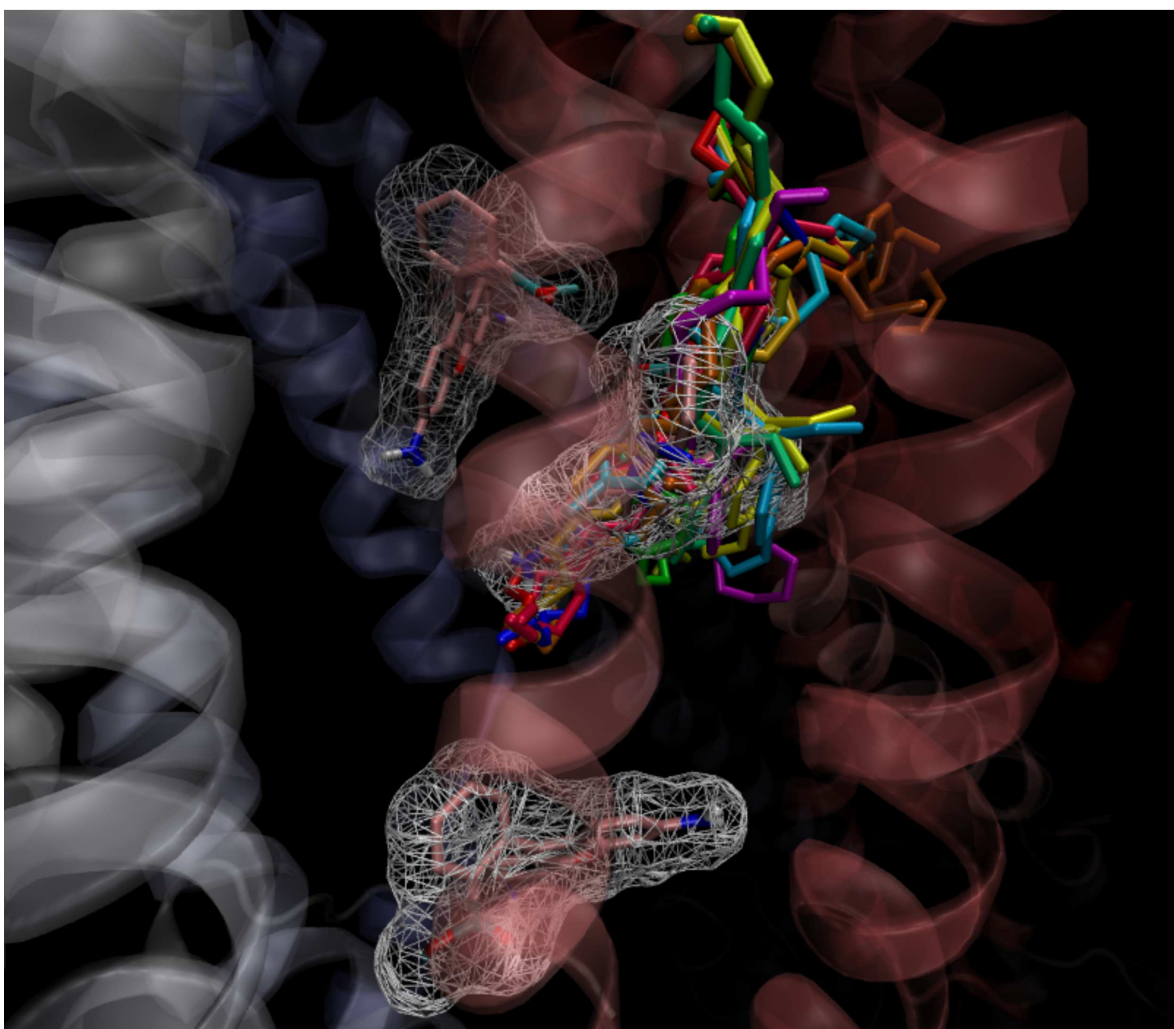


Figura 6.9. Misma vista y colores que la figura anterior para el compuesto **26** y la Rho123.

En claro contraste con nuestros inhibidores, la CsA, mucho más flexible y voluminosa, se liga en una región que obstaculiza tanto los sitios primario y secundario (y aún otras poses de mayor energía) tanto de la Rho123 como de la DOX. Esto puede apreciarse en la Figura 6.10, donde se muestran las poses de la CsA desde -10 a -9 kcal/mol. Nótese que aún un sólo confórmero, el de más baja energía, ocupa ambas regiones. Algo similar, a pesar de su menor tamaño, ocurre con el verapamilo (Figura 6.11).

La Rho123 se utiliza como sustrato con una ubiquidad en numerosos trabajos de inhibición de la P-gp aún cuando no es un agente terapéutico de ninguna clase. Es interesante notar que en el caso de este sustrato, **26** y **27** inhibieron la acumulación de Rho123 claramente en menor medida que la de DOX, al contrario de verapamilo y CsA que tuvieron pocas diferencias al utilizar uno y otro sustrato. El tamoxifeno también mostró menor capacidad inhibitoria para DOX que para Rho123. En otras palabras, mientras los inhibidores propuestos y el tamoxifeno inhiben de manera muy diferente el eflujo de Rho123 y DOX, el verapamilo y la CsA presentan prácticamente las mismas efectividades indiferentemente del sustrato. La existencia de estas diferencias habían sido sugeridas e incluso observadas en trabajos anteriores,¹⁴ aunque no explicadas a nivel molecular con soporte experimental.

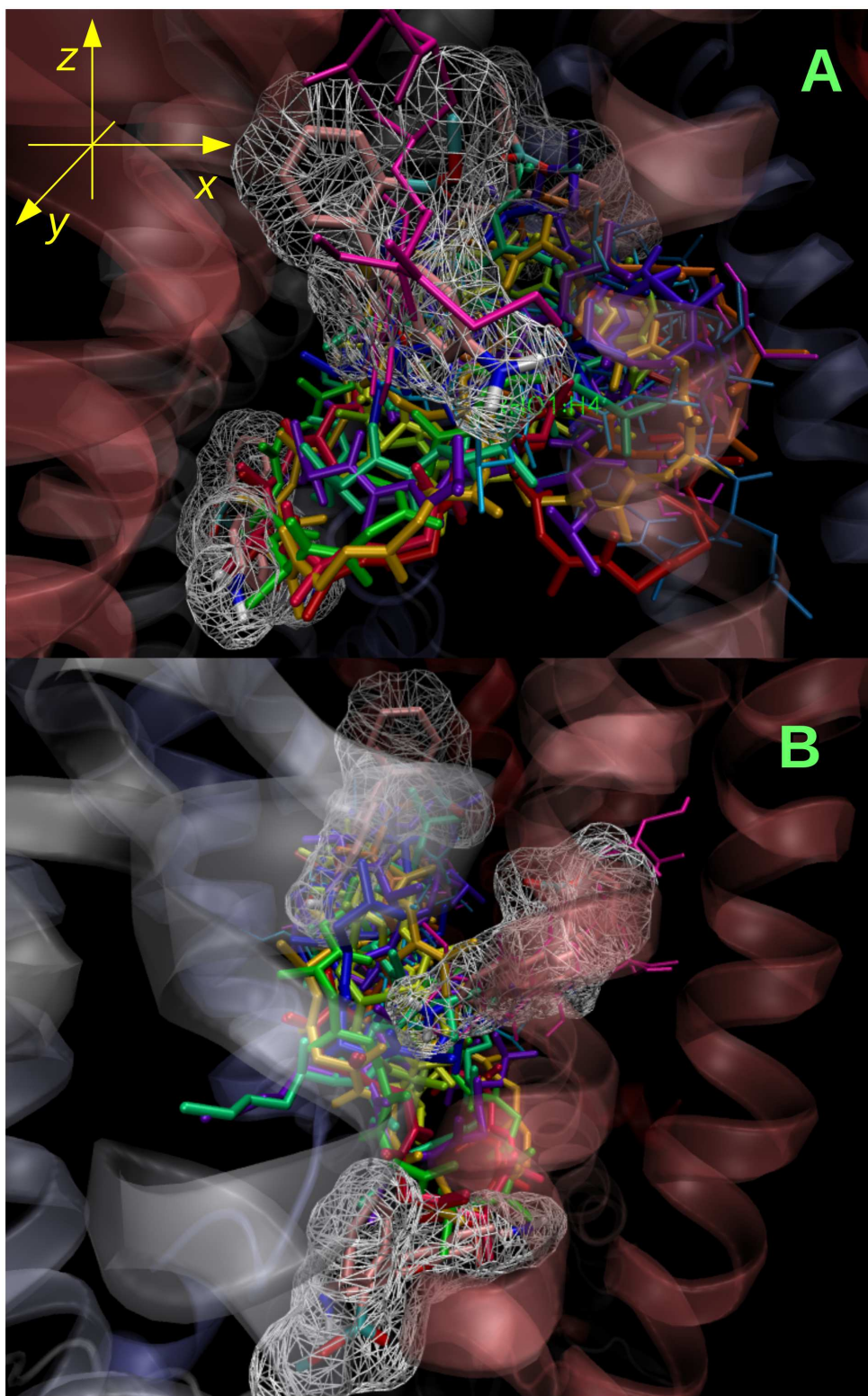


Figura 6.10. A) Superposición de las primeras poses de menor energía de la CsA (mismo esquema de color que las figuras anteriores, energías de -10 a -9 kcal/mol en arcoirs. La pose de menor energía se superpone con los tres sitios de menor energía de la Rho123, las siguientes poses se superponen en todos los casos con al menos dos de los sitios de Rho123 (del mismo modo que lo hacen en el caso de DOX). B) Vista rotada -90 grados sobre el eje X.

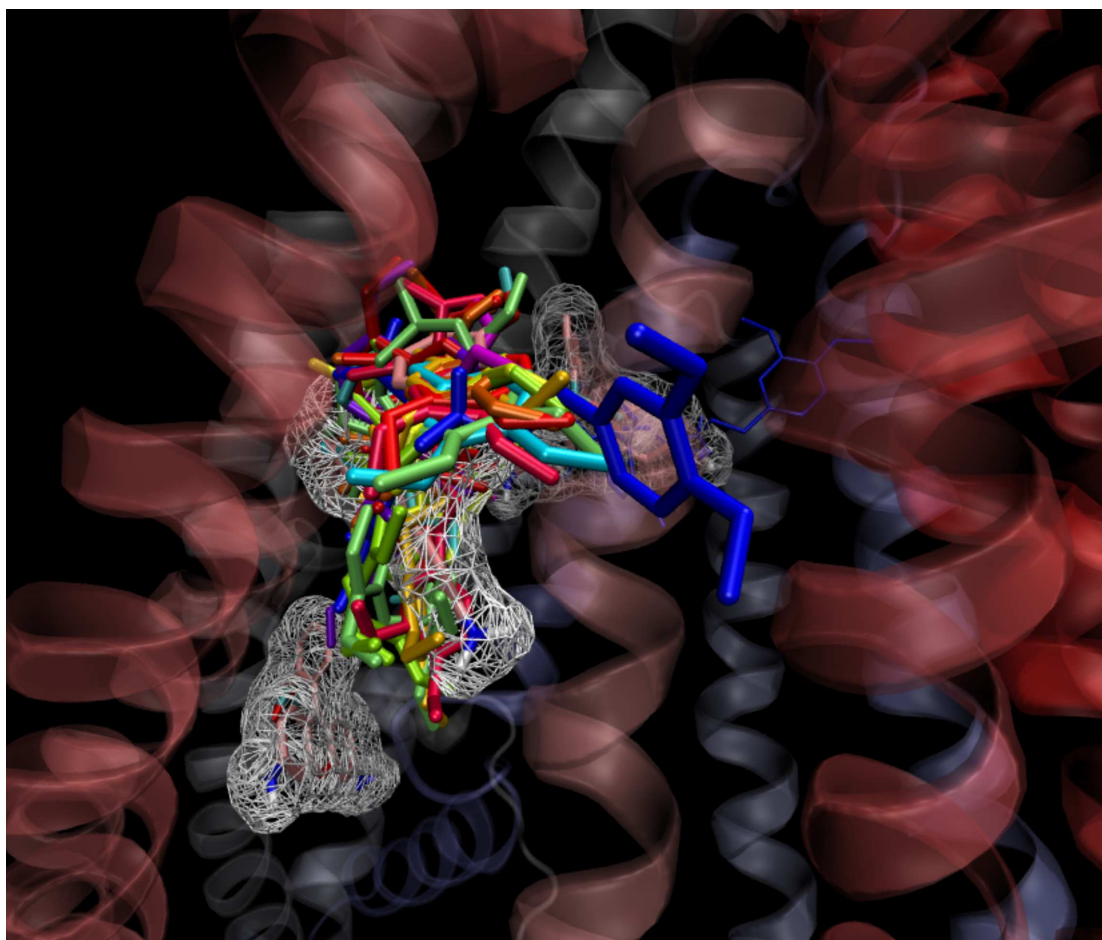


Figura 6.11 En menor medida que CsA, las primeras poses de menor energía del verapamilo se superponen con múltiples sitios de la Rho123. Esquema de color como en las figuras anteriores, energías de -9.07 a -7.97 kcal/mol.

6.3 Soporte experimental.

6.3.1 Ensayo de inhibición del eflujo de DOX

Se llevaron a cabo estos ensayos por parte del grupo colaborador de la UCC a fin de identificar los mejores inhibidores capaces de revertir el fenotipo asociado a las células cancerosas MDR/P-gp. De entre los compuestos estudiados *in silico* mostrados en las Figuras 1-3, se ensayaron experimentalmente los compuestos más prometedores y disponibles. Las medidas involucraron los controles negativos y positivos,ⁱ los compuestos cedidos por Kikelj y colaboradores **2-9**, dos de los obtenidos de la lista de similaridad, **23** y **21**, uno con la máxima y

i Tres controles negativos se ensayaron en el capítulo anterior, se mencionó el CA como ejemplo; estos fueron estudiados tanto por citometría de flujo (en las mismas condiciones que en este trabajo) como por otros ensayos y no se repitieron. El tariquidar sólo se usó como referencia a partir de los datos de bibliografía, por ser lejos el más efectivo, a pesar de su toxicidad. El verapamilo se describió en el cap. anterior, pero sus medidas experimentales fueron repetidas en estos estudios. El tamoxifeno y la CsA se incluyeron en los estudios descritos en este capítulo, y no habían sido medidos experimentalmente por el grupo colaborador con anterioridad.

otro con media actividad en términos de energías de docking y los compuestos que completan el requisito de similaridad a **1** en combinación con antagonismo de PXR, los derivados del dietilestilbestrol **26-30**. (Ver Información Suplementaria, Capítulo 6).

Para los ensayos de acumulación de DOX se empleó citometría de flujo usando como modelos las células de leucemia mieloide crónica, Lucena 1 (el 58% de esta línea sobreexpresa P-gp). En cada caso se repite el mismo ensayo en la línea celular sensible K562 (sólo el 2% de las células expresan P-gp) a fin de descartar cualquier otro sinergismo entre los compuestos y el fármaco fluorescente que no involucrase a la P-gp. La retención del fármaco citotóxico DOX que es además fluorescente, dentro de las células, se usó para medir la capacidad de una sustancia para inhibir el transporte hacia el exterior mediado por P-gp. La inhibición del eflujo se correlacionó positivamente con la concentración intracelular de DOX.

Como se mencionó en la sección anterior, y en buen acuerdo con los resultados de docking, de los agonistas de PXR, **2-6** exhibieron poca actividad mientras que **7-9** fueron comparables al pinosresinol,¹⁵ con concentraciones de DOX intracelular en células Lucena 1 con valores de Relación de Intensidad de Fluorescencia (FIR) correspondientes a 1.06, 1.19 y 1.16, respectivamente, a 25 μM , resultando comparables a mejores que los compuestos conocidos verapamilo y tamoxifeno. Los compuestos **26** y **27** mostraron reversión aún en concentraciones menores a 0.5 μM . Ninguno de los compuestos causó un aumento significativo en la acumulación de DOX en la línea celular K562 (Información Suplementaria, Capítulo 6), lo que indica que estos compuestos inhibieron específicamente el transporte mediado por P-gp, y superaron ensayos de toxicidad.¹⁷

6.3.2 Ensayo de inhibición del eflujo de rodamina 123.

La discusión sobre los diferentes sitios de unión de los sustratos Rho123 y DOX en relación a los de los inhibidores propuestos o tomados como referentes y sus posibles implicancias en el mecanismo de inhibición están plenamente soportados por los estudios experimentales de eflujo de Rho123 versus DOX. En este caso sólo se probaron los inhibidores más potentes obtenidos **26** y **27** y los controles positivos. (Información Suplementaria, Capítulo 6). En efecto, **26**, **27** y tamoxifeno tuvieron mucha menor acumulación intracelular de Rho123 que de DOX. Por el contrario verapamil y CsA (Figs 6.10 y 6.11), tuvieron poca selectividad respecto de cualquiera de los sustratos.

6.4 Dinámica molecular del modelo de P-gp(h) en solución y docking flexible

La simulación en solvente acuoso se utilizó para obtener un análisis de clusters de un conjunto de estructuras representativas de distintas conformaciones energéticamente (y por tanto estadísticamente) relevantes del modelo de la proteína para introducir cierta flexibilidad al docking; luego se realizó el docking en 20 estructuras seleccionadas y previamente minimizados con 1000 etapas de gradiente conjugado (detalles del protocolo en el Capítulo 2.3.8).

La estructura de la P-gp humana conservó razonablemente la estructura por más de 10 ns, con un RMSD fluctuando en torno de no más de 3.6 Å; volviéndose prácticamente estacionario después de los primeros 0.75 ns de simulación libre (2.85 ps de tiempo total, teniendo en cuenta que los primeros 2.1 ns se simularon con una restricción armónica en el backbone, que luego se liberó completamente; estos resultados se muestran en la Fig. 6.12). Si bien el RMSD sería relativamente alto para una proteína soluble, es aceptable en el caso de una proteína transmembrana e incluso mejor que la obtenida en previas simulaciones empleando una estructura de rayos X de ratón experimental y un protocolo de dinámica diferente¹³.

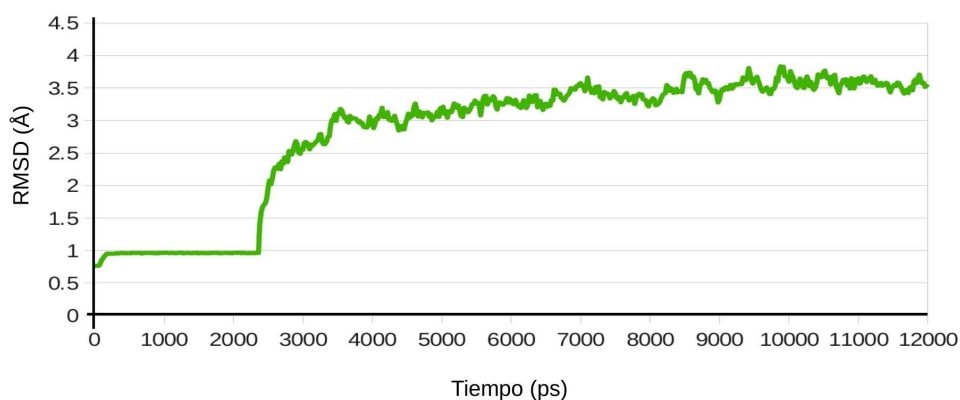


Figura 6.12 RMSD del backbone de la P-gp en solución; los primeros 2.3 ns son de calentamiento y preparativo.

La región entre 5 y 10 ns es la parte de la trayectoria que se utilizó para realizar análisis de clusters y aislar el set de estructuras representativas para posteriormente simular el docking flexible o dinámico de dos ligandos.

Al tener en cuenta la movilidad de la proteína simulada vía dinámica molecular se hizo un chequeo preliminar a fin de reevaluar el modo de ligado, el sitio de unión y la energía de binding de los inhibidores seleccionados: tariquidar, **9**, **21** y **26**. El principal objetivo de estas pruebas es además ensayar este protocolo para aplicarlo finalmente al modelo de proteína en membrana ya equilibrado, aunque estas simulaciones aún no habían terminado al finalizar la redacción de este trabajo de Tesis. A modo de ejemplo se muestra en la Figura 6.13 la superposición de las estructuras P-gp/inhibidor más estables obtenidas para tariquidar y **26**. Se observa que las estructuras más estables obtenidas por este protocolo van a la misma región que con las simulaciones de docking discutidas hasta aquí. Tampoco se observaron diferencias sustanciales (diferencias de energías libres de ligado menores a 0.4 kcal/mol con respecto al docking tradicional). Se remarca que la relación entre las ΔG_b^0 de tariquidar y **26** fueron muy similares también.

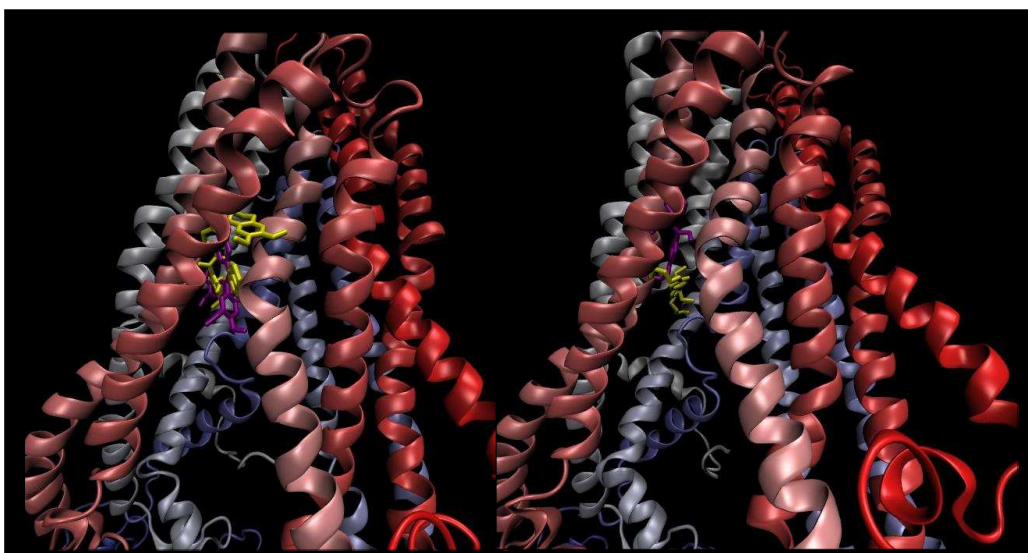


Figura 6.13. Sitio de unión del tariquidar (izquierda) y del compuesto **26** (derecha) en docking dinámico de la P-gp. Se observa en amarillo el conformero correspondiente a docking estático y en violeta al conformero de menor energía del docking dinámico. Se conserva el mismo sitio activo descrito con docking estático y se obtuvo una ΔG_b^0 en kcal/mol similar.

6.5 Preparación del modelo de la P-gp embebido en una membrana lipídica

En paralelo con los estudios anteriores, se realizó una dinámica molecular a partir del modelo de homología de P-gp(h) a fin de mejorarlo y acercarlo a las condiciones fisiológicas.

Se llevaron a cabo cuatro intentos y se evaluó la viabilidad de continuar o no con cada trayectoria luego de 50ns de simulación sin restricciones. El último intento resultó viable en términos de los valores de área por lípido, estabilización de la energía potencial topología de las interfases lípido/proteína y lípido/agua y RMSD de la proteína. El protocolo detallado en el Capítulo 2, ensayo y error mediante, fue encontrado como el más conveniente y se logró minimizar el sistema. A los 75ns de simulación, aún en equilibración, no se observó penetración de moléculas de agua en la región lipídica (Figura 6.14). El RMSD de la proteína osciló en 4.5 Å y la energía llegó a un nivel estacionario (Figura 6.15).

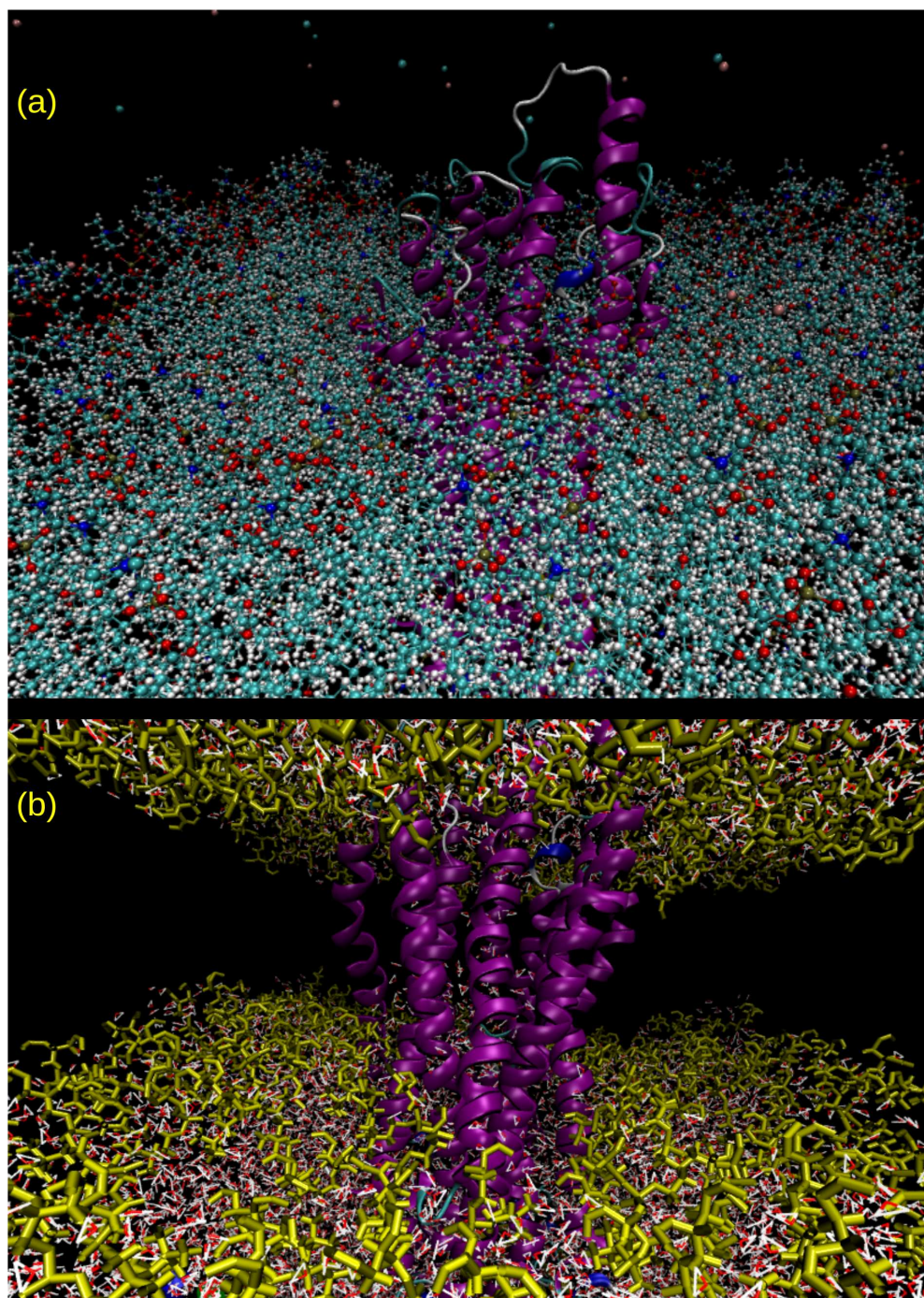


Figura 6.14. (a) Vista desde el lado extracelular, a 30° del plano de la proteína (cartoon) embebido en 287 moléculas de palmitoiloleilfosfatidil-colina (esferas y tubos); no se muestran las 60000 moléculas de agua. Las esferas celestes y rosas corresponden a iones potasio y cloruro. (b) A 57 ns de simulación, en amarillo, las cabezas polares de los lípidos (no las cadenas de oleato y palmitato, ocultas), la proteína en cartoon y las moléculas de agua en líneas rojas y blancas.

Este protocolo de simulación permitió proyectar a futuro nuevas simulaciones de docking y dinámica molecular, como analizar el comportamiento de otras conformaciones de la P-gp y la interacción de moléculas pequeñas con la bicapa lipídica. Tales sistemas son relevantes para

conocer mecanismos de acción de fármacos, aportando así abundante información ya que se sabe que las membranas celulares desempeñan un papel esencial para el equilibrio de cualquier proteína transmembrana cuando se desea extender el tiempo de su simulación. AMBER es particularmente adecuado para estos estudios debido a su resolución atómica, la inserción relativamente fácil de nuevas especies en el campo de fuerza y la velocidad de simulación. Los parámetros de equilibración se mantuvieron estables para longitudes de simulación considerablemente grandes (entre 50–250 ns).¹⁶

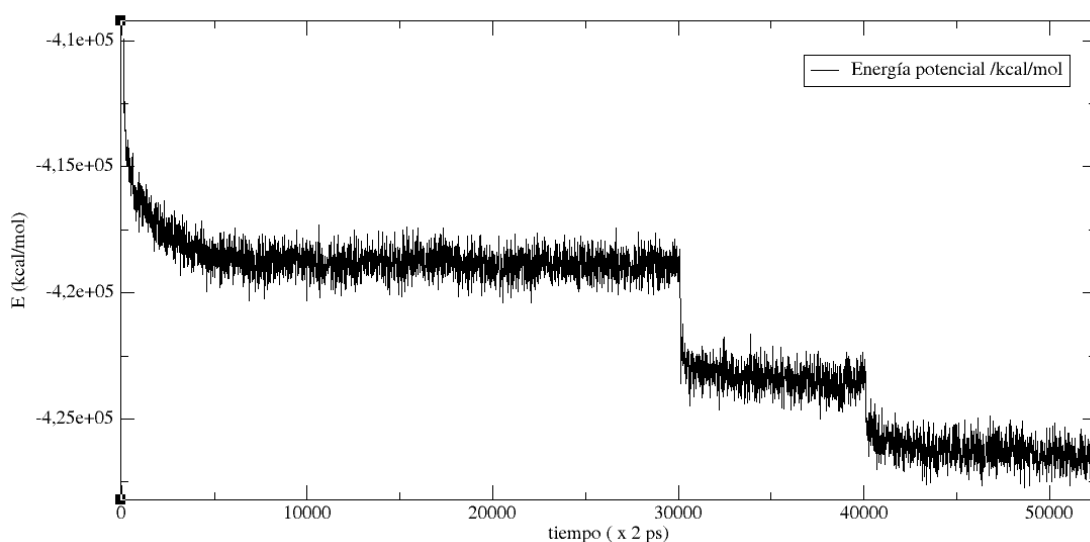


Figura 6.15. Monitoreo de la energía potencial en los primeros ps de simulación; las caídas corresponden a la liberación de la constricción en las cadenas laterales y luego en el backbone de la proteína.

6.6 Conclusiones

Los compuestos **26** y **27** ensayados constituyen puntos de partida prometedores para el desarrollo de inhibidores del transporte mediado por P-gp de fármacos quimioterapéuticos como la DOX. En conjunto, la mejor actividad de inversión sugiere que estructura de dietilestilbestrol es más beneficiosa para lograr la actividad inhibitoria de la P-gp que la del bazedoxifeno. La información obtenida sobre los requisitos estructurales para revertir el fenotipo MDR/P-gp arrojó luz sobre el diseño de otros nuevos compuestos relacionados con los derivados de pinosinol. Resultaron buenos candidatos para la evaluación experimental adicional como inhibidores de MDR en terapias de combinación antitumoral. De hecho, estudios experimentales demostraron

más afinidad que el verapamilo y representarían una alternativa menos tóxica que el tariquidar. Por otra parte, su actividad como agonistas de PXR en combinación con inhibidores de la P-gp los hace especialmente prometedores.

Un aspecto básico de la investigación, por demás interesante e inesperado, fue la especificidad no sólo de los nuevos inhibidores sino también de un sustrato conocido para evaluar el eflujo promovido por la P-gp(h). Esto tiene gran relevancia, puesto que en numerosos trabajos el fenómeno de eflujo se mide con Rho123, de bajo costo y alto rendimiento cuántico de fluorescencia, y por lo tanto popular y conveniente. Pero puede conducir a encontrar falsos negativos, con la aparejada pérdida de tiempo y recursos. Por otra parte la Rho123 *no es* un agente terapéutico como lo es la DOX (en este caso recomendada justamente como fármaco para tratamiento de la leucemia mieloide, consistentemente con la línea celular Lucena 1). Se plantea una seria advertencia, sugiriendo el uso de sustratos que realmente tengan relevancia quimioterapéutica tanto por los estudios computacionales como para los ensayos de letalidad, reversión o acumulación de intracelular de sustrato. Esto también abre la perspectiva de pensar en inhibidores de MDR específicos para cada tipo de tratamiento, especialmente si el antitumoral sustrato es estructuralmente muy diferente a DOX o al colorante.

La dinámica molecular de la proteína solvatada en agua se logró concluir, obteniéndose una estabilización de la misma a lo largo de 12000 ps. Las constantes de inhibición de docking tradicional y las obtenidas a partir del docking dinámico fueron congruentes, por esto se puede inferir que, a pesar de la dureza de la aproximación del docking tradicional, los resultados son consistentes, por lo que se infiere que el modelo de P-gp empleado, a pesar de tener una resolución promedio, es un buen modelo para predecir las energías de binding y describir la orientación de ligandos.

Dado que las bases de datos carecen hasta el momento de estructuras cristalográficas con buena resolución, resulta relevante obtener una simulación dinámica de la P-gp inmersa en bicapa lipídica, para lograr fidelidad de los residuos de transmembrana en un medio lipofílico a lo largo de simulaciones relativamente largas. Esto permitirá ahondar en la comprensión del mecanismo de interacción con sus sustratos e inhibidores en simulaciones más robustas.

Más allá de que los resultados fueron consistentes con los ensayos *in vitro* contribuidos por el grupo de la UCC, se logró un mecanismo de retroalimentación positivo entre el trabajo con productos de plantas, el modelado y el diseño, los ensayos *in vitro* y la síntesis para obtener

Modelado, diseño racional y desarrollo de compuestos de interés tecnológico y farmacológico

moléculas nuevas y prometedoras para potenciar las terapias contra el cáncer en el marco de tumores resistentes a múltiples drogas.^{15 17}

- (1) M. C. Carpinella, M. Rai. Novel therapeutic agents from plants; *Science publishers*, **2009**.
- (2) M Gosh, M Thapliyal, and K Gurumurthi. "Anticancer compounds of plant origin," in *Novel Therapeutic Agents from Plants*, eds M. C. Carpinella and M. Rai (*Enfield: Science Publisher*), **2009**, pp 1–35.
- (3) A. Palmeira E. Sousa, M.H. Vasconcelos, M. M. Pinto. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1946-2025.
- (4) Ž. Hodnik, L. Mašič, T. Tomašič, D. Smodiš, C. D'Amore, S. Fiorucci, D. Kikelj. Bazedoxifene-Scaffold-Based Mimetics of Solomonsterols A and B as Novel Pregnane X Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4819-4833.
- (5) B. Bauer, A. M. Hartz, G. Fricker, D S. Miller, Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol.* **2004**, *66*, 413-419.
- (6) M. Ott, G. Fricker, B. Bauer, Pregnane X receptor (PXR) regulates P-glycoprotein at the blood-brain barrier: functional similarities between pig and human PXR. *J Pharmacol Exp Ther.* **2009**, *329*, 141-149.
- (7) Ž. Hodnik, T. Tomašič, D. Smodiš, C. D'Amore, L. P. Mašič, S. Fiorucci, D. Kikelj. Diethylstilbestrol-scaffold-based pregnane X receptor modulators. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 551-562.
- (8) J. J. Irwin, B. K. Shoichet, ZINC—A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177–182.
- (9) ROCS 3.2.2.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>
- (10) P. C. C. Hawkins, A. G. Skillman, A. Nicholls. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 74-82.
- (11) D. Bajusz, A. Rácz, K. Héberger. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations?. *J. Cheminform.* **2015**, *7*, 20.
- (12) A. Rácz, D. Bajusz, K. Héberger, Life beyond the Tanimoto coefficient: similarity measures for interaction fingerprints. *J. Cheminform.* **2018**, *10*, 48.
- (13) G. E. Jara, D. M. A. Vera, A. B. Pierini .Binding of modulators to mouse and human multidrug resistance P-glycoprotein. A computational study. *J. Mol. Graph. Modeling.* **2013**, *46*, 10-21.
- (14) A. B. Shapiro, V. Ling. Positively cooperative sites for drug transport by p-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130–137.
- (15) M. L. González, D. M. A Vera, L. Laiolo, M. B. Joray, M. Maccioni, S. M. Palacios, P. A. Lanza, P. A. Gancedo, S. Rumjanek, M. C. Carpinella. *Frontiers in Pharmacology*, **2017**, *8*, 205.
- (16) C. J. Dickson, L. Rosso, R. M. Betz, R. C. Walker, I. R. Gould. GAFFlipid: a General Amber Force Field for the accurate molecular dynamics simulation of phospholipid. *oft Matter*, **2012** *S8(37)*, 9617.
- (17) J. Laiolo, T. Tomašič, D. M. A. Vera, M. L. González, P. A. Lanza, S. N. Gancedo, Z. Hodnik, L. Mašič, D. Kikelj, M. C. Carpinella. Analogs of the lignan pinoresinol as novel lead compounds for P-glycoprotein (P-gp) inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters.* **2018**, doi:10.1021/acsmchemlett.8b00324

Información Suplementaria

Table of Contents

Información Suplementaria del Capítulo 3.....	2
Información Suplementaria del Capítulo 4.....	4
Síntesis Experimental de díadas de Tröger.....	13
Información Suplementaria de los Capítulos 5 y 6.....	17

Información Suplementaria del Capítulo 3

Resumen de los cálculos de los estados excitados sobre el set de díadas propuestas in silico para encontrar los mejores candidatos para su evaluación. Se empleó TDDFT en solvente modelo LR (aproximado) a fin de tener una primera aproximación de sus propiedades.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

	Grupo dador	Grupo aceptor		λ 1er CT (nm)	Δ (HOMO- LUMO) (eV)	ΔE R- \rightarrow N + e-	ΔE N- \rightarrow R+ + e-	Gap Redox /eV
c1	4-carboxicianovinil- benceno	4-metoxi-carbazoll	S1	503.12	5.10	-2.06	0.44	2.50
c2	4-ciano-naftaleno	4-metoxi-benceno	S1	316.02	6.32	-2.94	0.67	3.61
c3	4-ciano-naftaleno	2-metil-4metoxi-benceno	S1	316.55	6.29	-2.94	0.64	3.58
c4	naftaleno	4-metoxi-benceno	S1	287.15	6.91	-3.70	0.56	4.25
c5	4-ciano-naftaleno	2-metil-4metoxi-benceno	S1	307.34	6.36	-3.04	0.60	3.65
c6	4-ciano-naftaleno	3,5-di-metoxi-benceno	S1	315.93	6.44	-2.95	0.95	3.91
c7	4-dicianovinil-ph	4-N,N-diarilamino-benceno	S1	376.34	4.64	-1.98	0.14	2.13
c8	4-dicianovinil-ph	4-(N,N-dimetoxibencil)- aminobenceno	S1	365.01	4.50	-1.99	-0.02	1.97
c9	2-metil-4-dicianovinil-ph	2-metil-4-(N,N-ditolil)- amino-benceno	S1	381.47	4.61	-2.00	0.09	2.09
c10	2-metil-4-dicianovinil-ph	2-metil-4-(N,N-ditolil)- aminobenceno	S1	373.42	4.51	-2.01	-0.03	1.98
c12	4-carboxicianovinil- benceno	4-(N,N-ditolil)- aminobenceno	S1	373.49	4.55	-1.92	-0.02	1.90
c13	2-metil-4- carboxicianovinil-benceno	4-(N,N-ditolil)- aminobenceno	S1	370.18	4.56	-1.99	-0.02	1.97
c14	2-metil-4-cianoviniltolueno	2-metil-4-(N,N-ditolil)- aminobenceno	S3	304.36	5.28	-2.79	-0.05	2.74
c15	2-metil-4- carboxicianovinil-benceno	2-metil-4-(N,N-ditolil)- aminobenceno	S1	368.7	4.55	-1.95	-0.05	1.90
c16	2-metil-4-dicianovinil-	2-metil-4-metoxi-benceno	S2	322	5.43	-2.01	0.63	2.64

c17	benceno 2-metil-4-dicianovinil- benceno	2-metil-4-(N,N-dimetil)- aminobenceno	S1	371.78	4.85	-2.03	0.04	2.07
c21	2-metil-4-ciano-benceno	2-metil-4-(N,N-dianisil)- aminobenceno	S4	279.32	5.91	-3.46	-0.04	3.42
c27	2-metil-4-(N,N-ditolil)- aminobenceno	2-metil-4-(N-(m- trifluorometil)-fenil, N-(4- (N-acridil)-fenil)- aminobenceno	S4	279.32	5.05	-2.58	0.09	2.67
c25	2-metil-4-(N,N-dianisil)- aminobenceno	2-metil-4-(N-(m- trifluorometil)-fenil, N-(4- (N-acridil)-fenil)- aminobenceno	S8	289.66	4.92	-2.59	-0.06	2.53

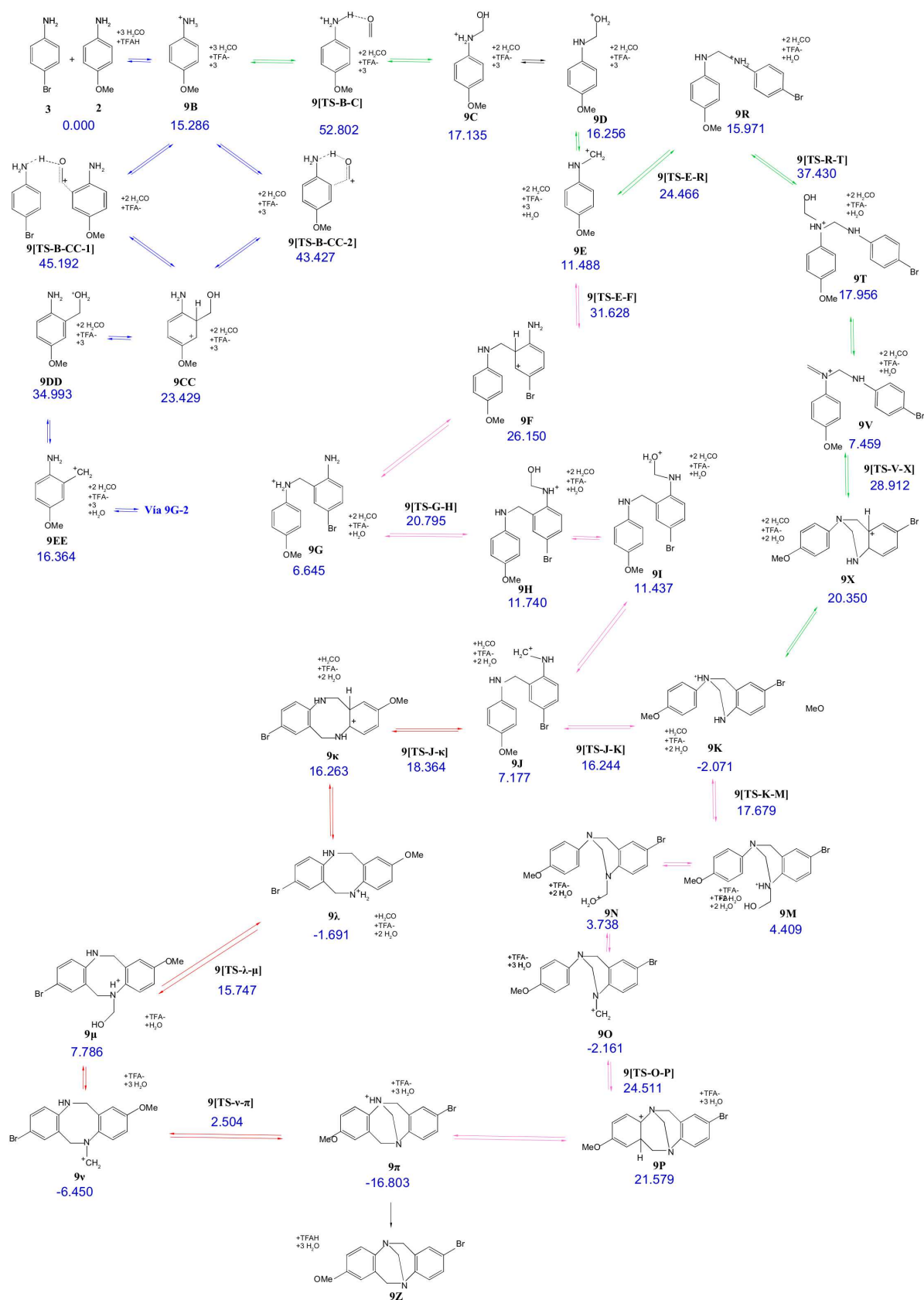
Información Suplementaria del Capítulo 4

Se muestran a continuación los mecanismos planteados y calculados para el resto de las reacciones detalladas en la Figura 4.1. Las energías libres (ΔG^0) relativas están expresadas en kcal/mol. Los colores de las flechas corresponden a las **Via I**, **Via II**, **Via III**, **Via IV** y **Via V**.

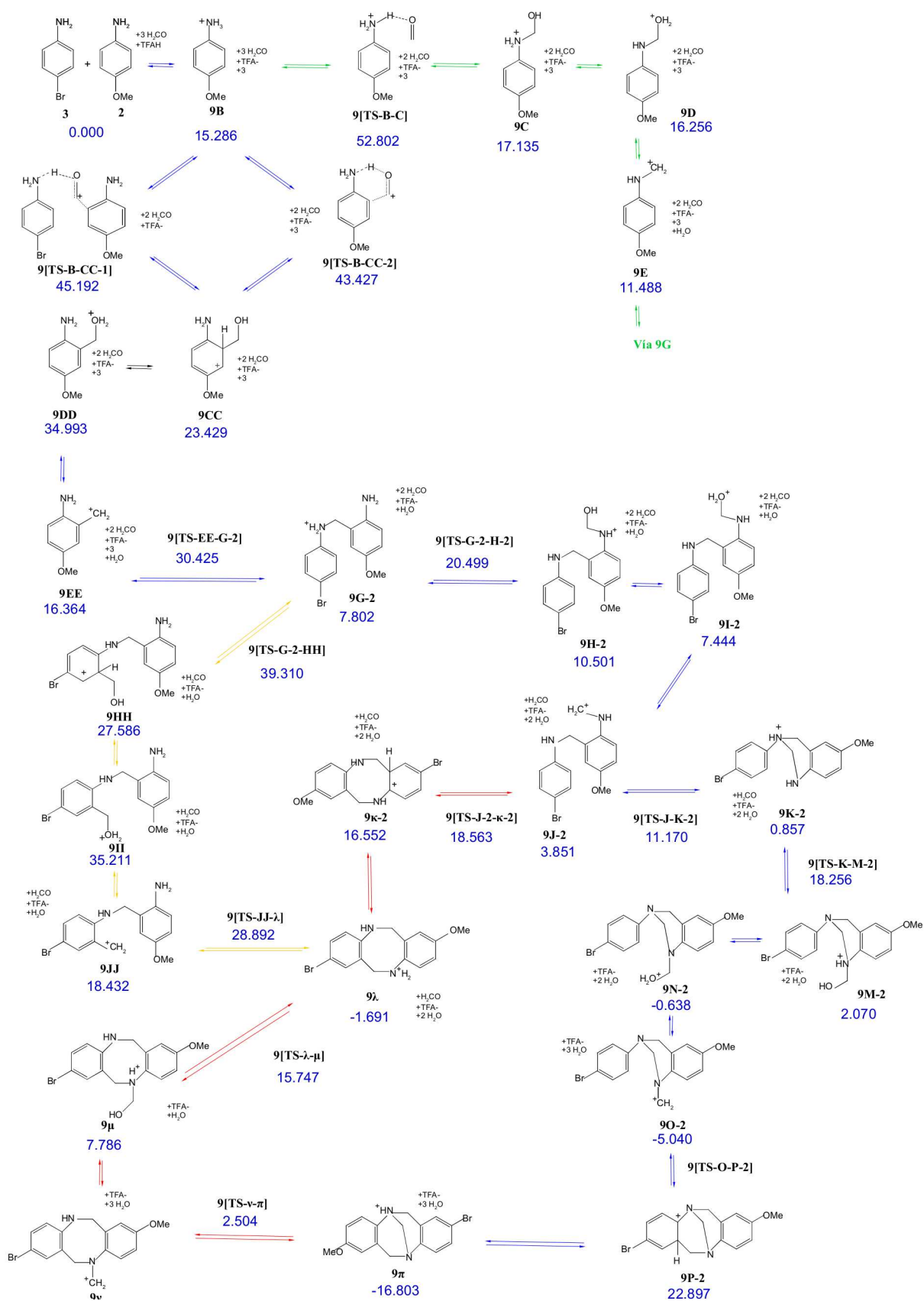
En los gráficos de perfiles de ΔG^0 no se reportan los TS correspondientes a la pérdida de una molécula de agua.

Se anexan las energías en hartrees para cada uno de los compuestos detallados en las vías de mecanismos, para cada una de las reacciones nombradas en la Figura 4.1.

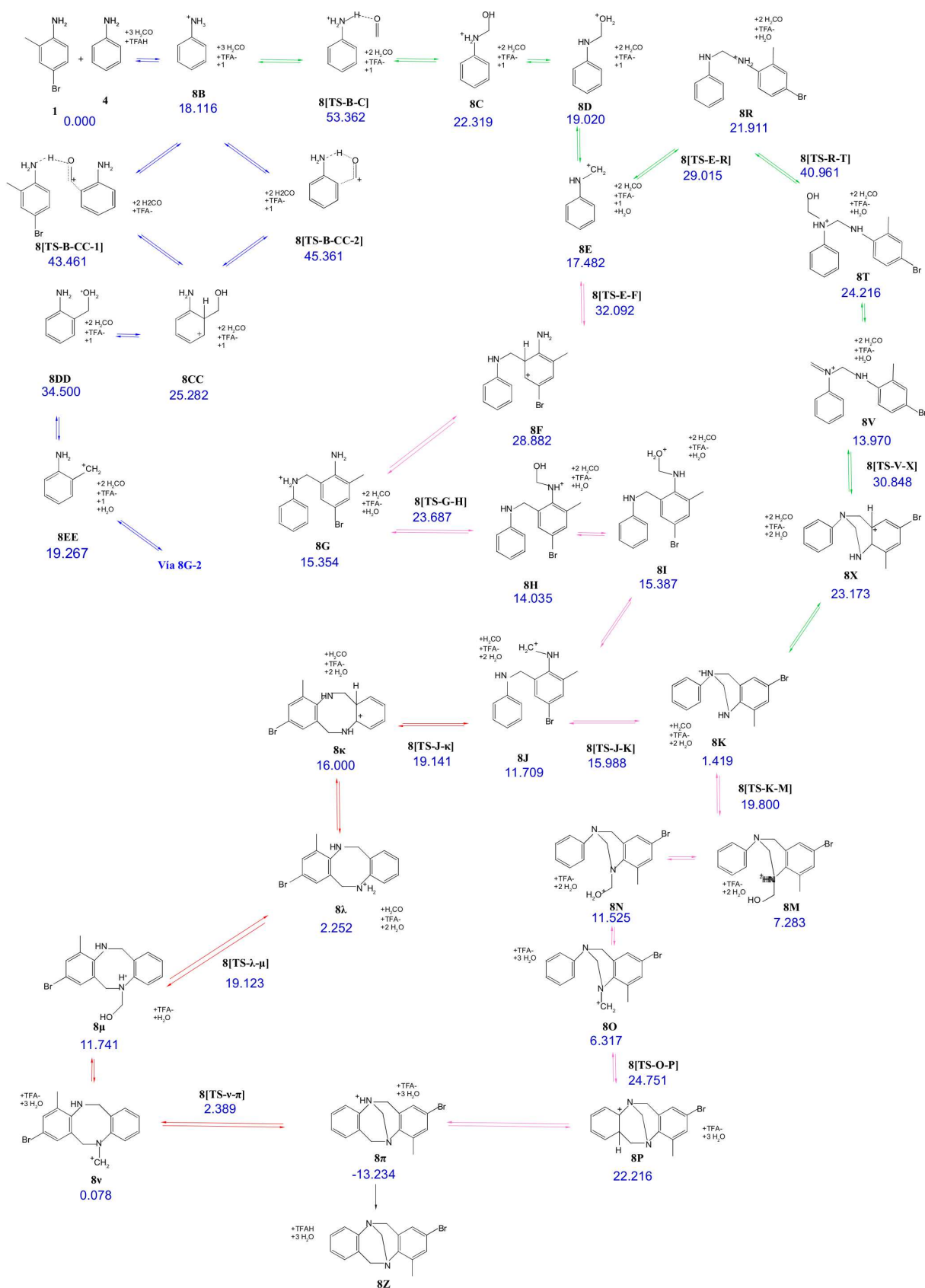
Modelado, diseño racional y desarrollo de compuestos de interés tecnológico y farmacológico



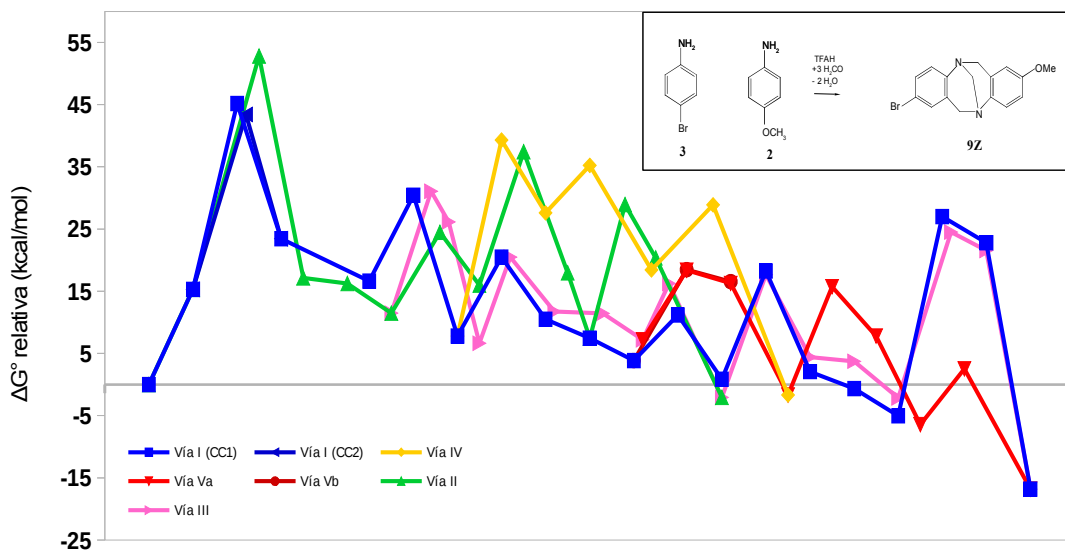
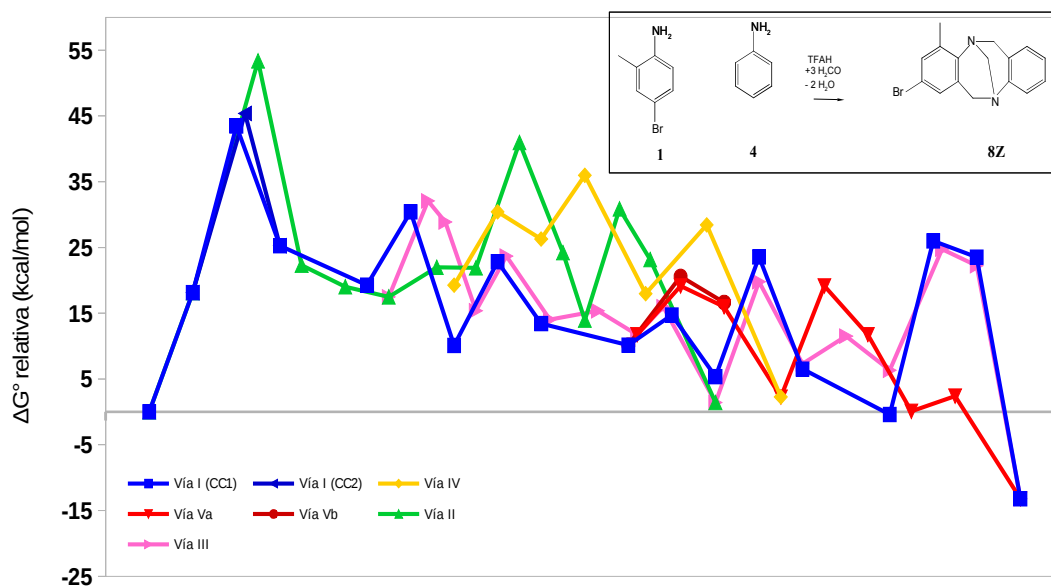
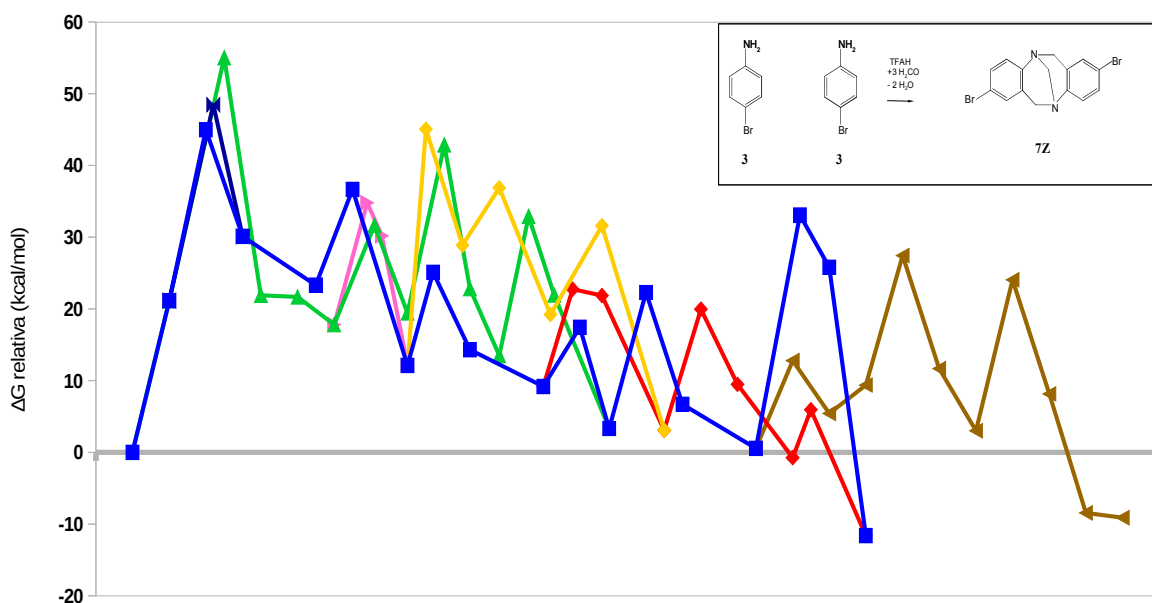
Modelado, diseño racional y desarrollo de compuestos de interés tecnológico y farmacológico



Modelado, diseño racional y desarrollo de compuestos de interés tecnológico y farmacológico



Modelado, diseño racional y desarrollo de compuestos de interés tecnológico y farmacológico



Tablas de energías calculadas con el nivel de teoría de CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) para el estudio del mecanismo de síntesis de la reacción 1+1

1+1			
Compuesto	G°(Hartree)	Compuesto	G°(Hartree)
H ₂ O	-76.4330	L	-5876.8769
TFA-	-526.3845	TS-K-M	-5991.7398
TFAH	-526.8171	N	-5991.7609
H ₂ CO	-114.4900	O	-5915.3430
H ₃ CO ⁺	-114.8454	Q	-5915.3814
1	-2900.3729	TS-O-P	-5915.2974
B	-2900.7724	P tautomer C	-5915.3090
TS-B-C	-3015.2063	P tautomer 1	-5915.3665
TS-B-CC2	-3015.2192	P. tautomer	-5915.3665
TS-B-CC1	-5915.5970	TS-E-R	-5839.1840
CC	-3015.2493	R	-5839.2011
DD	-3015.2373	TS-R-T	-5953.6541
EE	-2938.8268	S	-5838.8014
TS-EE-G	-5839.1722	T	-5953.6880
TS-G-HH	-5953.6532	U	-5953.6904
HH	-5953.6812	TS-U-V	-5953.6721
II	-5953.6661	V	-5877.2685
JJ	-5877.2617	TS-V-X	-5877.2390
TS-JJ-λ	-5877.2379	X	-5877.2560
C	-3015.2595	TS-J-κ	-5877.2570
D	-3015.2627	κ	-5991.7667
E	-2938.8342	λ	-5877.2875
TS-E-F	-5839.1802	TS-λ-μ	-5991.7478
F	-5839.1900	μ	-5991.7629
G	-5839.2180	ν	-5915.3479
TS-G-H	-5953.6832	φ1	-5915.3297
H	-5953.6994	φ2	-5915.2787
I	-5953.6986	φ3	-5915.3495
J	-5877.2737	TS-ν-π	-5915.3403
TS-J-K	-5877.2642	π (igual a P	-5915.3665
K	-5877.2867	5Z	-5914.9577

Tablas de energías calculadas con el nivel de teoría de CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) para el estudio del mecanismo de síntesis de la reacción 1+2

1+2					
Compuesto	G°(Hartree)	Compuesto	G°(Hartree)	Compuesto	G°(Hartree)
H ₂ O	-76.4330	Q-2	-3416.9473	P tautomer 0	-3416.8611
TFA ⁻	-526.3845	TS-O-P-2	-3416.8556	P tautomer 1	-3416.9190
TFAH	-526.8171	P-2	-3416.8608	P. tautomer 2	-3416.9230
H ₂ CO	-114.4900	TS-G-HH	-3455.2081	TS-E-R	-3340.7493
H ₃ CO ⁺	-114.8454	HH	-3455.2305	R	-3340.7532
1	-2900.3729	II	-3455.2106	TS-R-T	-3455.2081
2	-401.9193	JJ	-3378.8122	S	-3340.3481
B	-402.3275	TS-JJ-λ	-3378.7931	T	-3455.2444
TS-B-CC2	-516.7726	C	-516.8145	U	-3455.2451
TS-B-C	-516.7577	D	-516.8159	TS-U-V	-3455.2249
TS-B-CC1	-3417.1427	E	-440.3905	V	-3378.8254
CC	-516.8045	TS-E-F	-3340.7322	TS-V-X	-3378.7939
DD	-516.7860	F	-3340.7401	X	-3378.8085
EE	-440.3828	G	-3340.7710	TS-J-κ	-3378.8103
TS-EE-G	-3340.7335	TS-G-H	-3455.2391	κ	-3378.8143
G-2	-3340.7677	H	-3455.2515	λ	-3378.4245
TS-G-H-2	-3455.2382	I	-3455.2484	λ1	-3378.8381
H-2	-3455.2519	J	-3378.8253	λ2	-3378.8411
I-2	-3455.2550	TS-J-K	-3378.8131	TS-λ-μ	-3493.3013
J-2	-3378.8280	K	-3378.8426	μ	-3493.3145
TS-J-K-2	-3378.8197	L	-3378.4268	ν	-3416.9047
TS-J-κ-2	-3378.8093	TS-K-M	-3493.3006	ν tau2	-3416.8924
κ-2	-3378.8131	M	-3493.3214	TS-ν-π	-3416.8926
K-2	-3378.8312	N	-3493.3120	π (igual a P τ	-3416.9239
TS-K-M-2	-3493.2940	O	-3416.8957	φ1	-3416.8393
M-2	-3493.3234	Q	-3416.9354	φ2	-3416.8887
N-2	-3493.3306	TS-O-P	-3416.8524	φ3	-3416.8942
O-2	-3416.9028			6Z	-3416.5070

Tablas de energías calculadas con el nivel de teoría de CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) para el estudio del mecanismo de síntesis de la reacción 3+3

3+3					
Compuesto	G°(Hartree)	Compuesto	G°(Hartree)	Compuesto	G°(Hartree)
H ₂ O	-76.4330	TS-G-H	-5875.1319	X	-5798.7039
TFA ⁻	-526.3845	H	-5875.1491	TS-J-κ	-5798.7026
TFAH	-526.8171	I	-5875.1507	κ	-5798.7041
H ₂ CO	-114.4900	J	-5798.7243	λ	-5798.7340
H ₃ CO ⁺	-114.8454	TS-J-K	-5798.7111	TS-λ-μ	-5913.1971
H ₂	-1.1727	K	-5798.7336	μ	-5913.2138
3	-2861.0962	L	-5798.3252	ν	-5836.7971
B	-2861.4950	TS-K-M	-5913.1933	φ1	-5836.7288
TS-B-C	-2975.9310	M	-5913.2182	φ2	-5836.7807
TS-B-CC2	-2975.9415	N	-5913.2223	φ3	-5836.7863
TS-B-CC1	-5837.0432	O	-5836.7950	TS-ν-π	-5836.7864
CC	-2975.9707	Q	-5836.8388	π (igual a P tau	-5836.8144
DD	-2975.9603	TS-O-P	-5836.7432	7Z	-5836.4056
EE	-2899.5486	P tautomer 0	-5836.7548	TS-O-OII	-8697.8717
TS-EE-G	-5760.6235	P tautomer 1	-5836.8144	O-II	-8697.8834
TS-G-HH	-5875.1000	P. tautomer 2	-5836.8144	O-II-Tau	-8697.8771
HH	-5875.1259	TS-E-R	-5760.6314	TS-II-III	-8812.3383
II	-5875.1131	R	-5760.6509	O-III	-8812.3635
JJ	-5798.7083	TS-R-T	-5875.1035	O-IV	-8735.9443
TS-JJ-λ	-5798.6885	S	-5760.2493	TS-IV-V	-8735.9107
C	-2975.9838	T	-5875.1355	O-V	-8735.9361
D	-2975.9842	U	-5875.1414	O-VI	-8735.9625
E	-2899.5574	TS-U-V	-5875.1203	O-VII	-8735.9636
TS-E-F	-5760.6264	V	-5798.7174	O-VIII	-8734.8054
F	-5760.6338	TS-V-X	-5798.6865	O-IX	-8734.7857
G	-5760.6626				

Tablas de energías calculadas con el nivel de teoría de CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) para el estudio del mecanismo de síntesis de la reacción 1+4

1+4					
Compuesto	G°(Hartree)	Compuesto	G°(Hartree)	Compuestc	G°(Hartree)
H ₂ O	-76.4330	O	-3302.4045	II	-3340.7331
TFA ⁻	-526.3845	Q	-3302.4459	JJ	-3264.3289
TFAH	-526.8171	TS-O-P	-3302.3751	TS-JJ-λ	-3264.3122
H ₂ CO	-114.4900	P tautomer 0	-3302.3791	TS-J-κ	-3264.3270
H ₃ CO ⁺	-114.8454	P tautomer 1	-3302.4354	κ	-3378.8131
1	-2900.3729	P. tautomer 2	-3302.4356	λ	-3263.9396
4	-287.4380	G-2	-3226.2844	λ1	-3264.3554
B	-287.8417	TS-G-H-2	-3340.7541	λ2	-3264.3539
TS-B-C	-402.2755	H-2	-3340.7691	TS-λ-μ	-3378.8170
TS-B-CC2	-402.2883	I-2	-3340.7660	μ	-3378.8288
TS-B-CC1	-3302.6642	J-2	-3264.3413	ν	-3302.4191
C	-402.3250	TS-J-K-2	-3264.3340	φ1	-3302.3557
D	-402.3303	TS-J-κ-2	-3264.3247	φ2	-3302.4068
E	-325.8997	κ-2	-3264.3310	φ3	-3302.4090
TS-E-F	-3226.2494	K-2	-3264.3490	TS-ν-π	-3302.4107
F	-3226.2545	TS-K-M-2	-3378.8099	π (igual a	-3302.4356
G	-3226.2760	M-2	-3378.8371	TS-E-R	-3226.2543
TS-G-H	-3340.7527	N-2	-3378.8433	R	-3226.2656
H	-3340.7681	O-2	-3302.4152	TS-R-T	-3340.7252
I	-3340.7660	Q-2	-3302.4625	S	-3225.8634
J	-3264.3389	P-2	-3302.3771	T	-3340.7519
TS-J-K	-3264.3320	CC	-402.3203	U	-3340.7616
K	-3264.3553	DD	-402.3056	TS-U-V	-3340.7399
L	-3263.9414	EE	-325.8969	V	-3264.3353
TS-K-M	-3378.8159	TS-EE-G	-3226.2520	TS-V-X	-3264.3084
M	-3378.8359	TS-G-HH	-3340.7238	X	-3264.3206
N	-3378.8291	HH	-3340.7486	8Z	-3302.0238

Síntesis Experimental de díadas de Tröger¹

Procedimiento general para la preparación de 2-bromo-4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocinas

Los precursores bromados se sintetizaron haciendo reaccionar 2,50 mmol de 4-bromo-anilinas 1a, 2,50 mmol de anilinas 1b-e y 10,00 mmol de p-formaldehído en 8 ml de ácido trifluoroacético (TFA). Después de un día, las reacciones se inactivaron con 30 ml de una solución de hidróxido de amonio al 20% v / v y el precipitado resultante se purificó por cromatografía en columna usando un gradiente de hexano / acetato de etilo para dar el producto.

2-bromo-4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo claro con un rendimiento del 32%, p.f. 135–136.5 °C.

2-bromo-4,8-dimetil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 33%, p.f. 125–126 °C.

2-bromo-8-metoxi-4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo con un rendimiento del 45%, p.f. 127–128 °C.

8-bromo-N, N, 10-trimetil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocin-2-amina. Este producto se obtuvo como un sólido verde amarillento con un rendimiento del 42%, p.f. 153–154 °C.

Procedimiento general para la preparación de 4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbonitrilos

Una mezcla de 0,10 mmol de diazocinas bromadas 2a-d y 0,40 mmol de CuCN en 1,50 ml de DMF se irradió en microondas (pulso inicial de 850 W) durante 30 minutos a 250 °C con una agitación de 1200 rpm utilizando un sistema de irradiación cerrado. Posteriormente, el crudo se extrajo con agua y acetato de etilo (4x20 ml) para dar los productos **4a-d**. Por lo tanto, no había necesidad de purificar el producto.

4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbonitrilo. Este compuesto se obtuvo como un sólido gris con un rendimiento del 77%, p.f. 158–160 °C.

4,8-dimetil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbonitrilo. Este producto se obtuvo como un sólido gris con un rendimiento del 99%, p.f. 158–159°C.

8-metoxi-4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbonitrilo. Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 99%, p.f. 138–140 °C.

8- (dimetilamino) -4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbonitrilo. Este compuesto se obtuvo como un sólido verde amarillento con un rendimiento del 99%, p.f. 124,5 - 125,0°C.

¹ Realizada por el grupo colaborador de la UNC.

Procedimiento general para la preparación de 4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbaldehído.

Una mezcla de 1.00 mmol de los derivados de TB 2a-d con 2.00 mmol de BuLi 2M en hexano en 10 ml de tolueno seco / THF (30/1) se hizo reaccionar bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas a -15 ° C. Después de esto Se agregaron 2,00 mmol de DMF y pudo reaccionar durante 2 horas más a -15 ° C. Posteriormente, la reacción se detuvo agregando 10 ml de agua fría para degradar el exceso de BuLi y el producto de reacción se extrajo con 5 lavados de 20 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas se mezclaron, se secaron con MgSO₄ y el disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación se llevó a cabo utilizando cromatografía en columna y utilizando gradiente de hexano / acetato de etilo como fase móvil.

4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbaldehído.

Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo pálido con un rendimiento del 30%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): H = 9.81 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.17 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 7.00 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.69 (dd, J = 38.3, 16.8 Hz, 2H), 4.47 - 4.19 (m, 3H), 4.04 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ_C = 191.6, 152.37, 147.65, 133.79, 132.25, 131.8, 130.18, 128.46, 126.80, 127.40, 126.74, 125.66, 124.20, 66.99, 58.32, 54.68, 16.89 ppm.

4,8-dimetil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbaldehído.

Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo pálido con un rendimiento del 34%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): H = 9.80 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.05 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.66 (dd, J = 43.9, 16.6 Hz, 2H), 4.37 - 4.20 (m, 3H), 4.00 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.22 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ_C = 191.48, 152.55, 145.04, 133.85, 133.75, 131.94, 130.15, 128.58, 127.32, 127.15, 126.84, 124.96, 67.16, 58.59, 54.91, 20.83, 17.88, 17.88, 17.98.

8-metoxi-4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbaldehído.

Este compuesto se obtuvo como un sólido naranja amarillento con un rendimiento del 34%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): H = 9.81 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.09 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.66 (dd, J = 34.0, 16.8 Hz, 2H), 4.31 (dd, J = 29.3, 12.8 Hz, 2H), 4.18 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 4.01 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.46 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ_C = 191.52, 156.26, 152.48, 140.50, 133.73, 131.98, 130.16, 128.56, 128.43, 126.88, 126.16, 114.21, 110.82, 67.25, 58.54, 55.40, 55.4, 17.30 ppm.

8- (dimetilamino) -4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocina-2-carbaldehído.

Este compuesto se obtuvo como un sólido naranja rojizo con un rendimiento del 30%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): H = 9.81 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.05 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 6.24 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.66 (dd, J = 26.0, 16.7 Hz, 2H), 4.32 (dd, J = 38.7, 11.9 Hz, 2H), 4.17 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 4.01 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 2.84 (s, 3H), 2.46 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ_C = 191.55, 152.77, 147.91, 137.31, 133.69, 131.90, 130.00, 128.80, 127.99, 127.01, 125.70, 113.14, 109.84, 67.42, 58.48, 55.33, 40.90, 17.29 ppm.

Procedimiento general para la preparación de 2 - ((4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocin-2-il) metileno) malononitrilo.

Una mezcla de 0,15 mmol de los derivados de aldehído de la TB - 5a, d - con 0,17 mmol de malononitrilo y utilizando 5 mg de quitosano como catalizador, se hizo reaccionar en 9 ml de etanol como disolvente a 40 ° C durante 6 h. Después de eso, la reacción se dejó enfriar y se filtró a presión atmosférica para eliminar el catalizador. El disolvente se evaporó a presión reducida para obtener el producto deseado sin la necesidad de purificación.

2 - ((4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocin-2-il) metileno) malononitrilo.

Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo con un rendimiento del 90%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): H = 7.58 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.22-7.14 (m, 2H), 7.04-7.00 (m, 1H), 6.93 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.69 (dd, J = 21.7, 16.8 Hz, 2H), 4.30 (dt, J = 29.9, 14.9 Hz, 13H), 4.05 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 2,44 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ_c = 159.12, 153.37, 147.39, 134.45, 131.88, 129.29, 128.60, 127.78, 127.69, 127.58, 126.90, 126.35, 125.28, 124.44, 114.25, 113.05, 108.63, 67.14. 58.43, 55.07, 20.82, 17.29 ppm.

2 - ((4,8-dimetil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocin-2-il) metileno) malononitrilo.

Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo con un rendimiento del 90%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): H = 7.57 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.06-7.00 (m, 2H), 6.73 (s, 1H), 4.65 (dd, J = 27.2, 16.8 Hz, 2H), 4.30 (dd, J = 37.7, 13.1 Hz, 2H), 4.19 (d, J = 17.0 Hz, 1H), 4.01 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,23 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ_c = 159.09, 153.48, 144.75, 134.39, 134.05, 131.78, 129.38, 128.60, 127.73, 127.18, 127.13, 126.33, 125.00, 114.25, 113.05, 108.63, 67.14. 58.43, 55.07, 20.82, 17.29 ppm.

2 - ((8-metoxi-4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocin-2-il) metileno) malononitrilo.

Este compuesto se obtuvo como un sólido naranja oscuro con un rendimiento del 93%. Esta TB derivada se obtuvo como un sólido amarillo con un rendimiento del 90%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): H = 7.58 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.08 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.65 (t, J = 17.1 Hz, 2H), 4.30 (dd, J = 35.4, 12.7 Hz, 2H), 4.15 (d, J = 17.1 Hz, 1H), 4.02 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.44 (s, 3H) ppm. ¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ_c = 159.12, 156.37, 153.39, 140.20, 134.37, 131.80, 129.36, 128.29, 127.77, 126.39, 126.21, 114.33, 114.25, 113.07, 110.85, 79.88, 67.23, 58.29, 58.31, 55.41, 55.21, 17.32 ppm.

2 - ((8- (dimetilamino) -4-metil-6,12-dihidro-5,11-metanodibenzo [b, f] [1,5] diazocin-2-il) metileno) malononitrilo.

Este compuesto se obtuvo como un sólido marrón oscuro con un rendimiento del 80%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): H = 7.57 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.04 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.65 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 6.23 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.64 (dd, J = 16.7, 9.2 Hz, 2H), 4.30 (dd, J = 46.1, 13.2 Hz, 2H), 4.14 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 4.02 (d, J = 17.1 Hz, 1H), 2.85 (s, 3H), 2.43 (s,

3H) ppm. ^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ_{C} = 159.13, 153.73, 147.97, 136.93, 134.31, 131.66, 129.63, 127.89, 127.86, 126.29, 125.75, 114.30, 113.19, 113.09, 112.93, 109.62, 67.42, 58.33, 55.56, 55.6 , 17.30 ppm.

Información Suplementaria de los Capítulos 5 y 6

Análisis estadístico de los ensayos experimentales

Los resultados de los ensayos *in vitro* se expresan como media \pm SE. El análisis de los datos se llevó a cabo con el software *GraphPad Prism* (*Graphpad Prism 5.0, Graphpad Software, Inc., CA, EE. UU.*). La diferencia estadística en la acumulación de Rho123 o DOX y la potenciación de su citotoxicidad de este último en ausencia y presencia de los compuestos analizados se calcularon mediante la prueba *t de Student* pareada (de una cola). La comparación de la actividad de los compuestos con respecto al verapamilo, tamoxifeno y CsA se calculó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con Bonferroni como prueba posterior. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Cada experimento se llevó a cabo al menos por triplicado (réplica biológica). Los valores de IC 50 se calcularon a partir de la curva de dosis-respuesta mediante el análisis del software *GraphPad Prism* que responde a, al menos, seis concentraciones con un nivel de confianza del 95% con límites de confianza superiores e inferiores.

Ensayo de reversión de resistencia a múltiples drogas

La capacidad de los compuestos seleccionados para sensibilizar células resistentes a DOX se evaluaron en células Lucena 1, así como en células K562 como control, mediante el ensayo colorimétrico de MTT². Ambas líneas celulares a una concentración final de 5×10^4 células / pocillo se colocaron en placas duplicadas de 96 pocillos con medio RPMI-1640 que contenía DOX solo (0.27-34 y 1.69-215 μM para K562 y Lucena 1, respectivamente) o DOX en combinación con 0.39-3.12 μM de cada compuesto previamente disuelto en DMSO³. Estas concentraciones se seleccionaron ya que son iguales o similares a las MEC (concentración mínima efectiva) obtenidas en el ensayo de acumulación de DOX. En la concentración más alta probada (3.12 μM), 26 y 27 no mostraron efectos tóxicos en ninguna de las líneas celulares

2 MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay: ensayo colorimétrico para evaluar la actividad metabólica celular.

3 DMSO: Dimethyl Sulfoxide

(citotoxicidad = 0 y $12.33 \pm 4.26\%$, respectivamente, en K562 y 0% para ambos compuestos en Lucena 1, determinada como se describe a continuación por el ensayo de proliferación de MTT:

Citotoxicidad (%) = $[1 - (\text{Tratamiento de densidad óptica} - \text{de densidad óptica DMSO}) / (\text{Control de densidad óptica} - \text{densidad óptica DMSO})] \times 100$

Los pocillos de control negativo recibieron solo un 0,5% de DMSO mientras que los controles de viabilidad solo contenían medio de cultivo suplementado. Se utilizó verapamilo como control positivo. Después de 48 h de incubación a 37 ° C con 5% de CO₂, se agregaron 20 µL de MTT (5 mg / mL) de solución en PBS estéril a cada pocillo y las placas se incubaron durante 4 h adicionales. Posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes y los cristales púrpura resultantes producidos a partir de células metabólicamente viables se disolvieron con 100 µl de DMSO. Finalmente, la absorbancia se leyó a 595 nm en un lector de microplacas *iMark* (Bio-Rad, EE. UU.). Los valores de la mitad de las concentraciones inhibitorias (IC 50) se determinaron como las concentraciones de DOX que causaron un 50% de inhibición de la proliferación celular (en comparación con los controles de disolvente, que no mostraron diferencias con respecto a los controles de viabilidad) y se calcularon a partir de los valores medios medidos.

Los valores reversión (*reversal fold* o FR) para los compuestos probados, que indican la relación para reducir la resistencia a DOX, se obtuvieron calculando la IC 50 de DOX solo / IC 50 de DOX en presencia de los compuestos probados.

Ensayos de acumulación intracelular de Doxorrubicina y rodamina 123

La cuantificación de la fluorescencia dentro de las células debido a la presencia del sustrato de fármaco quimioterapéutico fluorescente de P-gp, DOX, se utiliza como una forma específica para analizar la inhibición del flujo de salida de sustancias mediadas por P-gp. Se incubaron 5×10^4 células Lucena 1 o K562 ml⁻¹ por duplicado durante 1 h a 37 °C con 5% de CO₂ en placas de 96 pocillos que contenían medio RPMI-1640 completo, en presencia de 25 µM de cada compuesto probado previamente disuelto en DMSO. Después de la selección primaria, los compuestos con actividad prometedora se probaron en diluciones en serie con el objetivo de determinar sus concentraciones mínimas efectivas (MEC). Verapamilo, tamoxifeno y CsA como inhibidores conocidos de P-gp, y DMSO a 0.5% v / v (no se observaron efectos adversos a esta

concentración) se ejecutaron simultáneamente como controles positivo y negativo, respectivamente, mientras que un grupo de células con solo medio de cultivo se utilizó como control de viabilidad. Después de la incubación, se añadieron 5 μM de DOX y las células se incubaron adicionalmente durante 1 h en la oscuridad. Rho 123 es un sustrato fluorescente de P-gp empleado a menudo como un indicador de la actividad de P-gp y, por lo tanto, se utilizó en un estudio de acumulación adicional para probar la actividad de los compuestos seleccionados. Se realizó el mismo protocolo utilizado para el ensayo de acumulación de DOX, que se añadió a 500 ng / ml. Posteriormente, en ambos ensayos, las células se colocaron en hielo para detener las reacciones y se lavaron dos veces con PBS frío. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de DOX o Rho 123 retenida en 15,000 células individuales se determinó por citometría de flujo a una longitud de onda de excitación de 488 nm y la luz emitida se recogió con un filtro de paso de banda de 585/42 nm y 530/30 nm, respectivamente. Las células muertas y los residuos celulares se eliminaron mediante el bloqueo de las células vivas en la dispersión frontal y lateral. Las IMF fueron analizadas por el software *Flowjo* (Tree Star, Inc. Ashland, OR). La relación de intensidad de fluorescencia (FIR) se calculó dividiendo el MIF de DOX o Rho123 en presencia de los compuestos probados por el MIF de DOX o Rho123 solo.

Líneas celulares y cultivos celulares

Para seleccionar la actividad moduladora de la P-gp del conjunto de compuestos bajo análisis, se utilizaron la línea celular de leucemia mielógena crónica (LMC) humana K562 y su contraparte de MDR, Lucena 1. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U ml⁻¹ de penicilina y 100 μg / ml de estreptomycin a 37 ° C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Para mantener la resistencia al fármaco, se agregó DOX a 60 nM a la sublínea Lucena 1. Todos los experimentos se realizaron después de cuatro días en medio sin fármaco y con las células en la fase 4 de crecimiento logarítmico. La viabilidad celular por encima del 90% se determinó mediante tinción con *trypan blue*. Las células Lucena 1 mostraron una mayor expresión de P-gp en la superficie (58%) que las células K562 (2%), determinada por citometría de flujo utilizando anticuerpos de ratón anti-P-gp humana conjugados con FITC⁴.

4 Isotiocianato de fluoresceína

A continuación, examinamos el grado de resistencia de Lucena 1 mediante la determinación de la concentración de DOX requerida para inhibir el 50% de la proliferación celular (IC 50) utilizando el ensayo MTT.

Tabla Suplementaria 1: Ensayo de la reversión de la MDR medido por FIR mediante acumulación de DOX ⁵

Compuestos	FR										
	Concentración (µM)										
	25	12.50	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.098	0.048	0.024
2	0.80 ± 0.02										
5	1.01 ± 0.03										
7	1.06 ± 0.01*	1.10 ± 0.08	1.04 ± 0.03								
8	1.19 ± 0.03*	1.09 ± 0.02**	1.09 ± 0.07								
9	1.16 ± 0.08*	1.20 ± 0.04*	1.08 ± 0.007***	1.01 ± 0.06							
21	1.11 ± 0.06										
23	0.96 ± 0.01										
26	1.23 ± 0.08*	1.06 ± 0.02*	1.09 ± 0.01*	1.04 ± 0.009*/	1.05 ± 0.003*/	0.98 ± 0.02/					
				1.55 ± 0.09**	1.30 ± 0.12*	1.15 ± 0.11					
27	1.32 ± 0.12*	1.18 ± 0.07*	1.08 ± 0.02*	1.06 ± 0.01*/	1.10 ± 0.02*/	0.99 ± 0.02/	1.00 ± 0.02/				
				1.61 ± 0.14*	1.34 ± 0.07*	1.16 ± 0.08*	1.03 ± 0.03				
28	1.21 ± 0.07*	1.15 ± 0.05*	1.12 ± 0.02**	1.07 ± 0.009**	1.03 ± 0.03						
29	1.21 ± 0.03***	1.10 ± 0.02*	1.06 ± 0.02*	1.04 ± 0.01*	1.02 ± 0.01						

⁵ FIR: relación de intensidad de fluorescencia

30	1.18 ± 0.07*	1.10 ± 0.02*	1.09 ± 0.03**	1.08 ± 0.02*	1.01 ± 0.02						
Ver	1.35 ± 0.009***	1.26 ± 0.03**	1.20 ± 0.06*	1.16 ± 0.03*	1.07 ± 0.03*	1.07 ± 0.07					
Tam	1.13 ± 1.03*	1.07 ± 0.02*	1.05 ± 0.01*	1.01 ± 0.02							
CsA	1.40 ± 0.01*	1.47 ± 0.12*	1.44 ± 0.06**	1.47 ± 0.07**	1.46 ± 0.12*	1.43 ± 0.09*	1.30 ± 0.04**	1.25 ± 0.06*	1.16 ± 0.04*	1.15 ± 0.01**	1.01 ± 0.04

Ver: verapamilo. Tam: tamoxifeno.

El RF (Fold Reversal) fue calculado como “IC 50 de DOX solo / IC 50 de DOX en presencia de los compuestos seleccionados”. El análisis de las diferencias entre las acumulaciones intracelulares de Rho123 en las células tratadas con los compuestos probados en comparación con las células de control se realizó mediante el test t de una cola. Los resultados representan la media ± SE. *** p < 0,001, ** p < 0,01 y * p < 0,05. El ensayo se realizó a partir de una concentración de compuesto de 25µM y luego se repitió con concentraciones cada vez menores hasta llegar a un RF=1± 0.02.

Comparación teórico-experimental

Según la Tabla Suplementaria 1, durante el ensayo de reversión de la MDR se encontró que las concentraciones más bajas alcanzadas entre los compuestos propuestos *in silico* corresponden a las medidas para los compuestos 26 y 27, resultando activos hasta en concentraciones de 0.78µM y 0.39 µM respectivamente.

La comparación ideal teórico-experimental para evaluar los resultados de los capítulos 5 y 6 es la correlación entre la *binding energy* (BE) y la constante de inhibición experimental. Dado que dicho ensayo no se ha realizado hasta el momento, se realizó una aproximación con los datos del ensayo de la Tabla Suplementaria 1 haciendo valer los siguientes conceptos: 1) la fluorescencia de DOX es proporcional a su concentración; 2) cuanto mayor sea el RF, menor es la concentración de DOX necesaria para lograr la IC50, lo que es equivalente a una mayor acumulación de DOX intracelular y, por tanto, a un mayor efecto inhibitorio del compuesto. Entonces se tiene que K_i es proporcional a RF. Dado que BE es proporcional al $-\ln K_i^6$, BE

6 $\Delta G_{binding} = -RT \ln K_i$

también debería correlacionarse con $-\ln(\text{RF})$. El gráfico siguiente muestra una $R^2 = 0.74$, lo que sugiere que existe alguna congruencia entre los estudios *in vitro* e *in silico*.

Gráfico de correlación teórico-experimental

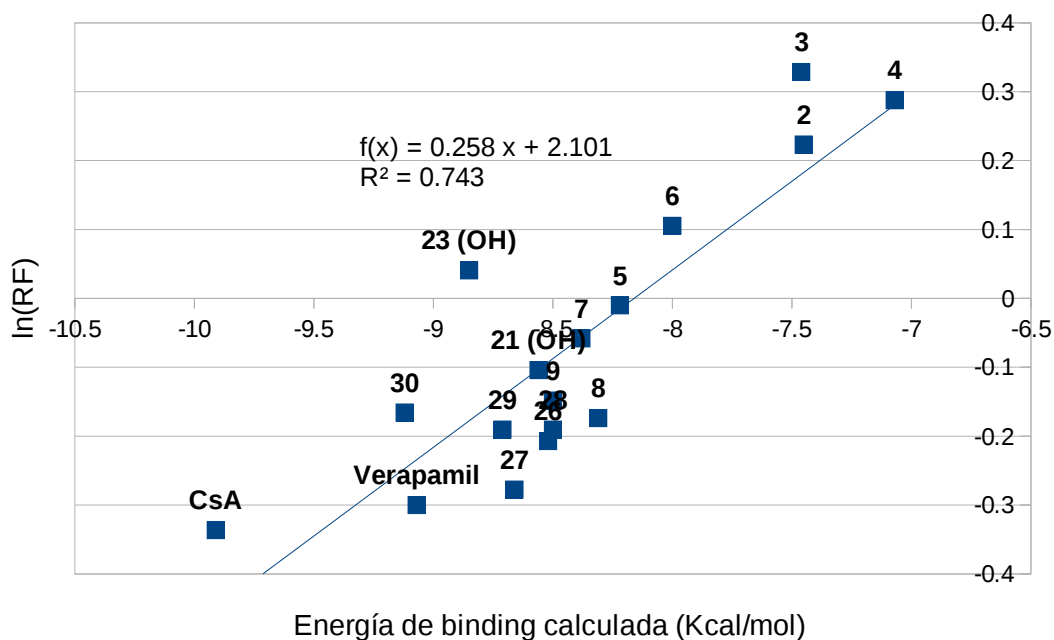


Figura Suplementaria 1: Correlación entre la energía de binding calculada, $\Delta G_{\text{binding}} = -RT \ln K_i$, y el RF correspondiente una concentración de compuesto igual a $25\mu\text{M}$.

Estos datos contribuirán a mejorar la predicción del método, tanto experimental como de cálculo. Si las desviaciones a la línea de tendencia se debieran al método *in silico*, se tiene que los compuestos 26 y 27 han arrojado una energía de binding calculada sobreestimada (menos negativa) de entre 0.5 y 1.0 kcal/mol comparada con la predicción ideal. Mientras que, si las desviaciones fueran originadas en los ensayos experimentales, se puede hacer una conjetura sobre el cambio en la expresión de la glicoproteína-P durante las 48hs de duración del ensayo, ya que ambos compuestos pertenecen a la quimioteca de antagonistas de PXR por lo que se espera que la

expresión de P-gp disminuya a lo largo del tiempo. Una posibilidad para poder explicar esta desviación e intentar corregir la línea de predicción teniendo en cuenta este planteo, sería agregar a la ecuación un factor extraído de ensayos de la expresión de la glicoproteína-P para cada uno de los compuestos estudiados.