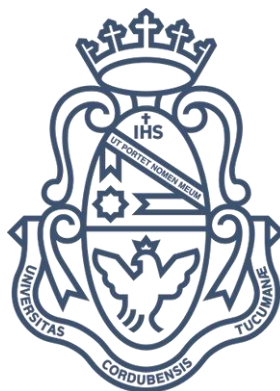


De 1,3-diaza heterociclos a compuestos fusionados
Síntesis, reactividad y estudios fotoquímicos



Martín Sebastián Faillace

TESIS DOCTORAL

Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Director: Walter José Peláez

-2019-

Página en blanco

El presente trabajo de tesis titulado “De 1,3-diaza heterociclos a compuestos fusionados. Síntesis, reactividad y estudios fotoquímicos” fue realizado en el INFIQC, Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de Walter José Peláez y se presenta en dicha Facultad para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Director de tesis:

Walter José Peláez

Comisión evaluadora:

Cristina Susana Ortiz

Gustavo Alejandro Argüello

Liliana Beatriz Jiménez

José Alberto Postigo
(evaluador externo)

Página en blanco

Agradecimientos

2019 Año Internacional de la Tabla Periódica

Dmitri Mendeleev publicó su sistema periódico para clasificar todos los elementos conocidos hace 150 años. Aquel sistema dio nacimiento a la tabla periódica que conocemos. Para celebrar su aniversario, la Asamblea General de las Naciones Unidas (*United Nations General Assembly*) y organizaciones educativas, científicas y culturales, proclamaron el 2019 como el Año Internacional de la Tabla Periódica (*International Year of the Periodic Table*).



Página en blanco

RESUMEN

Mediante la síntesis orgánica se han obtenido compuestos con diferentes utilidades, desde medicamentos hasta nuevos materiales. En este sentido, el químico que se encomienda a esta tarea está abocado al diseño de nuevos compuestos, o encontrar una vía alternativa para aquellos que escasean en la naturaleza. En este proceso, se parte de estructuras simples para generar aquellas más complejas, donde estas últimas poseen características pre-establecidas que definen sus potenciales aplicaciones; y así responder a tres preguntas básicas: ¿para qué?, ¿desde qué? y ¿cómo?

En este trabajo de tesis los sustratos de partida fueron la hidantoína **15** y la 2-tiohidantoína **16**. Estos 1,3- diaza heterociclos de cinco miembros son núcleos que por sí mismos no poseen ninguna actividad, sin embargo, sus derivados sintéticos sí han resultado ser biológicamente activos. Es por ello que a partir de **15** y **16** se sintetizaron familias de derivados oxigenados y azufrados, con diferentes sustituyentes arilo y, además, nuevos biciclos fusionados. Las estructuras de los principales 1,3- diaza heterociclos sintetizados se indican en Figura R.1.

De los compuestos bencil y benciliden(tio)hidantoínas se estudiaron algunas de sus actividades biológicas. En general, se observó que los compuestos azufrados presentaron una buena actividad antioxidante respecto a sus contrapartes oxigenadas. Por otra parte, se destacó la actividad moduladora a de las benciliden(tio)hidantoínas fluoradas (**12c** & **13c**) frente una cepa *Staphylococcus Aureus* SA1199B, la cual se caracteriza por tener sobre-expresada una proteína de eflujo norA que le otorga resistencia a norfloxacin.

Por otro lado, se estudiaron algunos aspectos fotoquímicos con el objetivo de indagar un poco más respecto a las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos. Estos estudios consistieron en la fotoisomerización y reversión térmica de las bencilidentioimidazolidinas **13a-c** y bencilidenimidazotiazolonas **14a-c**. De este modo, analizando la cinética de este proceso fue posible determinar algunos parámetros termodinámicos, tales como: ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger y ΔG^\ddagger . Además, se estudió la emisión de fluorescencia de esta familia de compuestos y resultó interesante ver los cambios que ocurrieron al interaccionar con estructuras más complejas, más específicamente, con ADN doble hebra y MOFs (*Metal Organic Frameworks*).

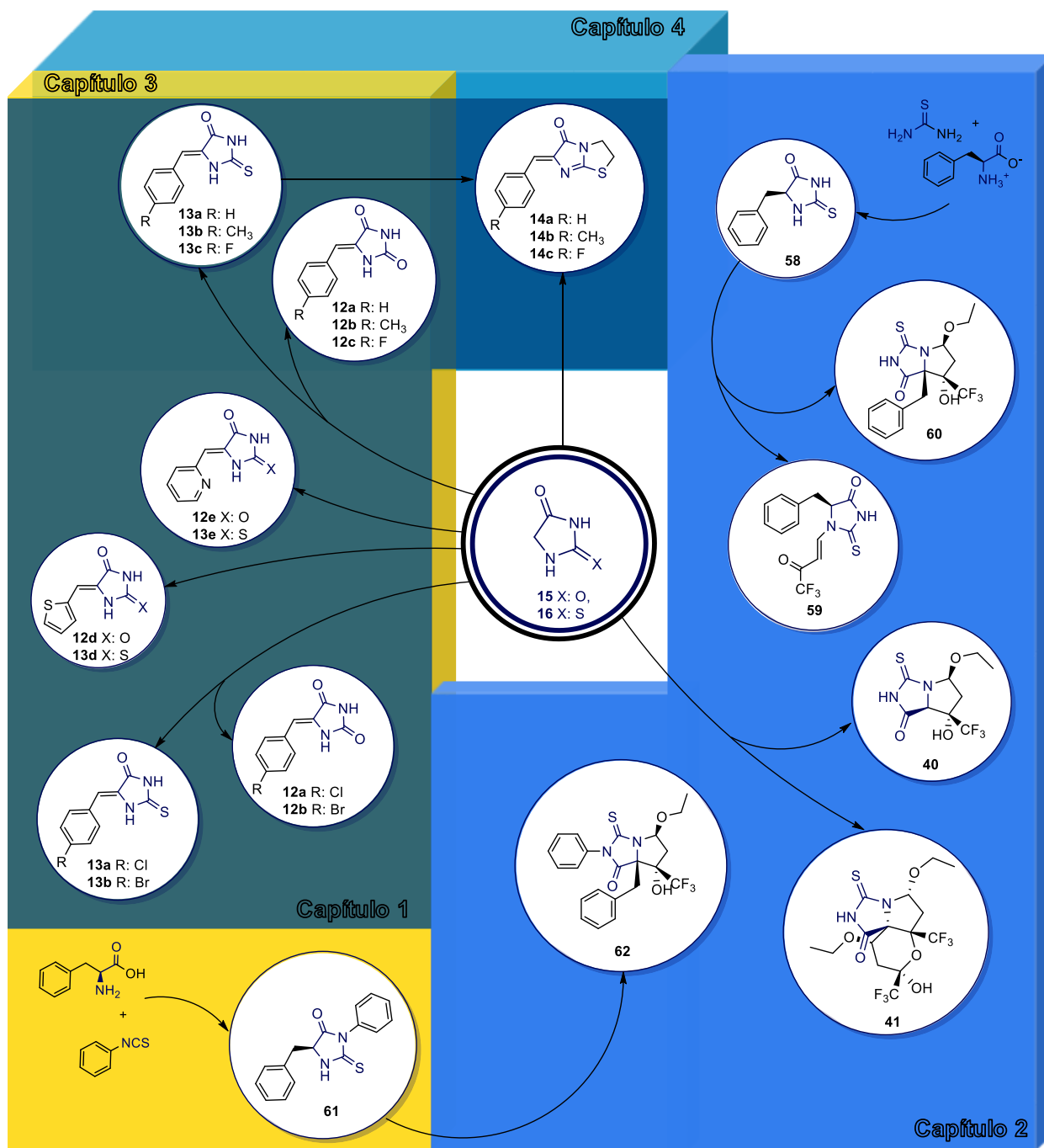


Figura R1: principales compuestos sintetizados y caracterizados en este trabajo de tesis, agrupados según los capítulos en dónde se desarrolla su estudio.

ABSTRACT

Through organic synthesis, compounds have been obtained with different practicalities, from medicines to new materials. In this sense, the assigned chemist would be dedicated to design either new compounds, or find an alternative method for those who are scarce.

Therefore, in this process, we start with simple structures to generate more complex ones, which has a pre-established characteristics that define their potential applications; and thus would answer three basic questions: what for? What from? And how?

In this thesis the starting substrates were hydantoin **15** and 2-thiohydantoin **16**. These 1,3-diaza five-member heterocycles does not have any relevant activity by themselves, But their synthetic derivatives have turned out to be biologically active. For this reason, families of oxygenated and sulfureted derivatives with different substituents, were synthesized from these heterocycles, generating new fused cycles. The structures of the main 1,3-diaza heterocycles synthesized are indicated in Figure R.1.

Biological activities of benzyl- and benzylidene- (thio)hydantoin compounds were studied. In this observation, it was discovered that the sulfureted compounds have a good antioxidant activity in contrast to their oxygenated counterparts. On the other hand, interesting results were obtained when the modulating activity was assayed with the fluoridated benzylidene(thio)hydantoins (**12c** & **13c**) against a strain *Staphylococcus Aureus* SA1199B, which is characterized by having an overexpressed NorA efflux protein due to the acquired resistance to norfloxacin.

On the other hand, some photochemical aspects were studied in order to investigate more about the physicochemical properties of these compounds. These studies included the photoisomerization and thermal reversion of the benzylideneimidazolidines **13a-c** and benzylideneimidazothiazolones **14a-c**. Henceforth, through the kinetics of this process, it was possible to determine some thermodynamic parameters, such as, ΔH , ΔS and ΔG . In addition, the fluorescence emission of this family of compounds was studied. Although in solution, they present a low fluorescence intensity, it is interesting to see the changes when they interact with more complex structures, more specifically, with double-stranded DNA and MOFs (Metal Organic Frameworks).

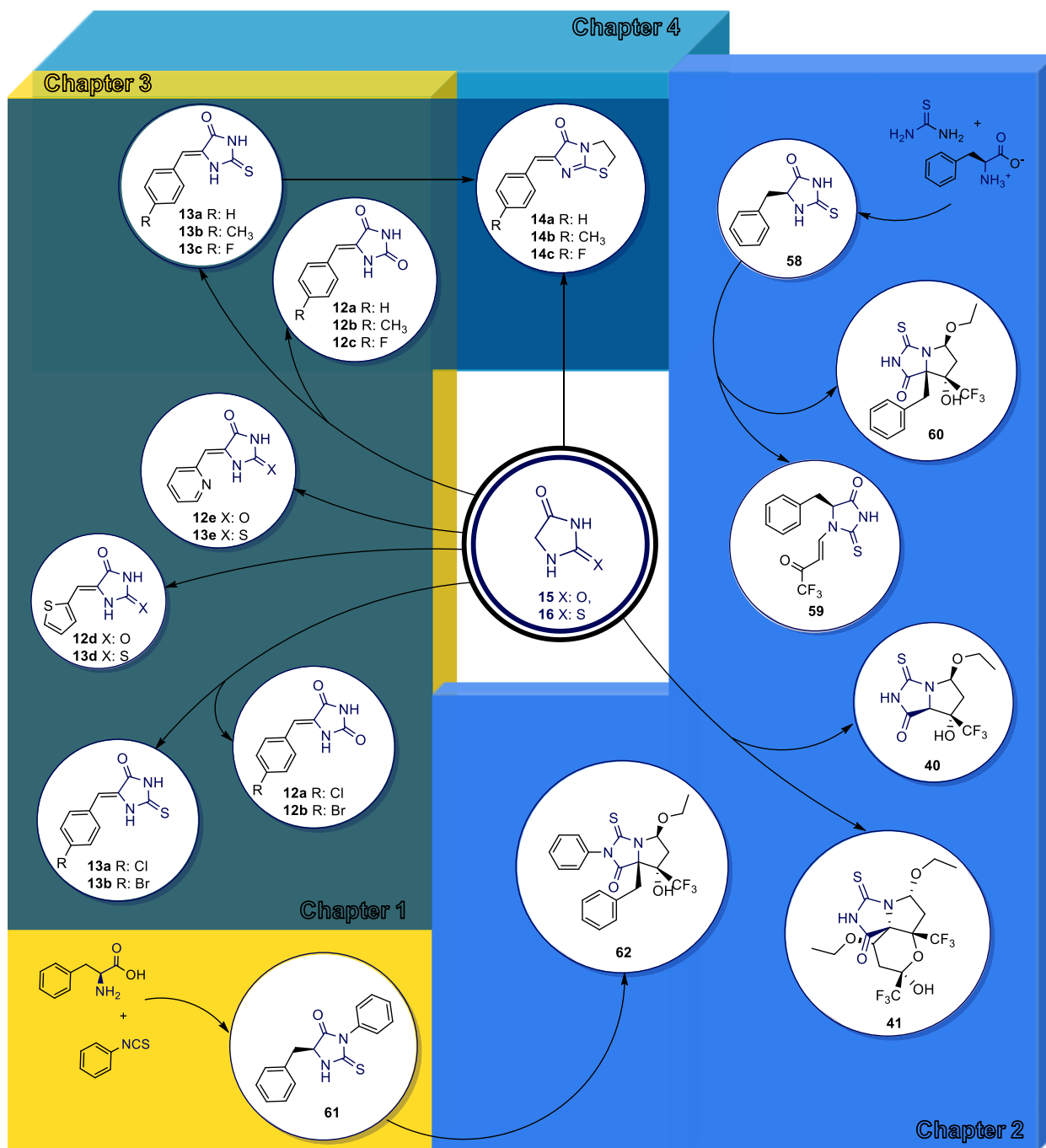


Figure R1: main synthesized and characterized compounds in this thesis. They are grouped according the chapter they are analyzed.

CONTENIDOS

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
PREFACIO 0	5
OBJETIVOS GENERALES.....	11
CAPÍTULO 1	13
1.1 INTRODUCCIÓN	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
1.3.1 <i>Benciliden imidazolidinonas</i>	21
1.3.2 <i>Benciliden imidazotiazolonas</i>	25
1.3.3 <i>Análisis del mecanismo de reacción</i>	28
1.3.4 <i>Caracterización de los cristales moleculares</i>	30
1.4 CONCLUSIONES PARCIALES.....	37
1.5 SECCIÓN EXPERIMENTAL	39
1.5.1 <i>Síntesis de benciliden imidazolonas e imidazotiazolonas</i>	39
1.5.2 <i>Curvas de calibración de 12a y 13a</i>	43
1.5.3 <i>Curvas de calibración por HPLC para 14(a-c)</i>	44
1.5.4 <i>Cristalografía de Rayos X</i>	44
CAPÍTULO 2	47
2.1 INTRODUCCIÓN	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
2.3.1 <i>Síntesis del building-block trifluoro acetyl vinil éter</i>	55
2.3.2 <i>Trifluorometilación de 2-tiohidantoína</i>	55
2.3.3 <i>Trifluorometilación de hidantoína</i>	67
2.3.4 <i>Trifluorometilación de 5-benciliden tiohidantoína</i>	69
2.3.5 <i>Trifluorometilación de 5-bencil-2-tioxoimidazolidin-4-ona</i>	71
2.3.6 <i>Trifluorometilación de 5-bencil-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-4-ona</i>	73
2.4 CONCLUSIONES	75
2.5 SECCIÓN EXPERIMENTAL	77
2.5.1 <i>Síntesis de TFAVE 31</i>	77
2.5.2 <i>Síntesis de 5-bencil-2-tioxoimidazolidin-4-ona 58</i>	77
2.5.3 <i>Síntesis de 5-bencil-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-4-ona 61</i>	78
2.5.4 <i>Reacciones de síntesis de trifluorometilación</i>	78
2.5.5 <i>Mediciones polarimétricas de 40 y 41</i>	80
2.5.6 <i>Determinaciones por HPLC</i>	80
2.5.7 <i>Determinaciones cristalográficas</i>	80
CAPÍTULO 3	83
ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE BENCILIDEN (TIO)OXOIMIDAZOLIDINONAS.....	83
3.1 INTRODUCCIÓN	85
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	91

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
3.3.1 Ensayos antioxidantes	93
3.3.2 Toxicidad contra <i>Artemia Salina</i>	104
3.3.3 Ensayos microbiológicos.....	105
3.4 CONCLUSIONES.....	111
3.5 SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	113
3.5.1 Ensayos antioxidantes	113
3.5.2 Toxicidad contra <i>Artemia Salina</i>	117
3.5.3 Ensayos microbiológicos.....	117
3.5.4 Análisis estadístico	119
CAPÍTULO 4.....	121
ESTUDIOS FOTOQUÍMICOS DE IMIDAZOLIN E IMIDAZOTIAZOLONAS	121
4.1 INTRODUCCIÓN.....	123
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	131
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	133
4.3.1 Fotoisomerización láser.....	133
4.3.2 Reversión térmica	137
4.3.3 Interacción de los 1,3-heterociclos con ADN doble hebra	141
4.3.4 Síntesis y caracterización de los 1,3-heterociclos dentro de MOFs	143
4.4 CONCLUSIONES.....	149
4.5 SECCIÓN EXPERIMENTAL	151
4.5.1 Fotoisomerización láser.....	151
4.5.2 Reversión térmica	151
4.5.3 Interacción de los 1,3-heterociclos con ADN doble hebra	151
4.5.4 Síntesis y caracterización de los 1,3-heterociclos dentro de MOFs	152
CONCLUSIONES GENERALES	153
ANEXOS	157
A1. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS	159
A.1.1. Equipos y metodologías utilizados	159
A.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO (PXRD).....	193
A.3. CURVAS DE CALIBRACIÓN UV-VIS	195
REFERENCIAS	197

LISTADO DE ABREVIATURAS

α -CH ₃ Py	α -picolina (2-metilpiridina)
%PR	Porcentaje de Incremento del Poder Reductor
AAPH	Diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
A _{CN}	Absorbancia del Control Negativo
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATFA	Anhídrido trifluoro acético
ATP	Adenosín trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
<i>A. Salina</i>	Artemia Salina
BHI	Infusión Cerebro Corazón (<i>Brain Heart Infusion</i>)
BrEt	Bromuro de Etidio
CCDC	<i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
CG	Cromatografía Gaseosa
CG-EM	Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas
CN	Control Negativo
DMF	Dimetilformamida
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
<i>E</i>	<i>Entgegen</i> (opuestos). Isómero <i>trans</i>
E _a	Energía de activación
EDG	Grupo donador de electrones (<i>Electron Donating Group</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)

EE	Éter Etílico
EEM	Error Estándar de la Media
EP	Éter de Petróleo
EPI	Inhibidores de Bomba de Eflujo (<i>Efflux Pump Inhibitors</i>)
ET	Transferencia de electrón(es) (<i>Electron Transfer</i>)
EtOH	Etanol
EWG	Grupo tomador de electrones (<i>Electron Withdrawing Group</i>)
GFP	Proteína Fluorescente Verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HAT	Transferencia de átomo(s) de Hidrógeno (<i>Hydrogen Atom Transfer</i>)
HR-MS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
IC	Conversión Interna (<i>Internal Conversion</i>)
ISC	Cruce entre Sistemas (<i>InterSystemen Crossing</i>)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>Low Density Lioprotein</i>)
LCA	Análisis de Ciclo de Vida (<i>Life Cycle Analysis</i>)
MAOS	Síntesis Orgánica Asistida por Microondas (<i>Microwave Assisted Organic Synthesis</i>)
MeOH	Metanol
MIC	Concentración Inhibitoria Mínima (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MDA	Malondialdehído
MO	Microondas
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot</i>
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos (<i>Photodiode Array</i>)
PBS	Tampón fostafo salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PMHs	Fenil metiliden hidantoínas (<i>Phenylmethylidene hydantoins</i>)
PMTHs	Fenil metiliden tiohidantoínas (<i>Phenylmethylidene thiohydantoins</i>)

PRTx	Poder Reductor relativo al Trolox
PXRD	Difracción de rayos X en polvo (<i>Powder X Ray Diffraction</i>)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ta	Temperatura ambiente
TE	Tris-EDTA
TEA	Trietilamina
TEAC	Capacidad Antioxidante Relativa al Trolox (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
Temp.	Temperatura
TFAVE	Trifluoro acetil vinil éter
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Species</i>)
t _R	Tiempo de retención
Trolox	ácido 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
R _f	Factor de retención (<i>Retention factor</i>)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
sat.	Saturado(a)
VR	Relajación Vibracional (<i>Vibrational Relaxation</i>)
UiO	Universidad de Oslo (<i>Universitetet i Oslo</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV-Vis	Ultravioleta-visible
Z	<i>Zusammen</i> (juntos). Isómero <i>cis</i>

Página en blanco

Prefacio 0

Página en blanco

Los compuestos heterocíclicos abundan en la naturaleza, y cumplen una gran cantidad de funciones biológicas, por lo que comprender la química de éstos ha dado explicación a numerosos procesos de gran importancia biológica, y consecuentemente, los conocimientos generados han contribuido de manera significativa a la química medicinal.^{1,2}

Los **heterociclos** son compuestos cíclicos que poseen uno o más heteroátomos, es decir, elementos diferentes al carbono. Los sistemas más comunes incluyen N, O o S, aunque se conocen estructuras cíclicas con otros elementos como B, P, As, Sn, Se, entre otros. En química orgánica, se pueden clasificar a los heterociclos en dos grandes grupos: **alifáticos** y **aromáticos**, lo cual los diferencia ampliamente, no sólo en sus propiedades, sino también en su reactividad. A su vez, se pueden distinguir a los heterociclos según su tamaño y la posición de los heteroátomos,³ de manera tal que permite referirse a su funcionalización teniendo en cuenta la estructura de los mismos. Dentro de este último aspecto resulta relevante destacar la diferencia entre heterociclos condensados y fusionados. Un **heterociclo condensado** consiste en un heterociclo unido a un resto aromático, mientras que un **heterociclo fusionado** está unido a un resto alifático o parcialmente saturado.⁴ Esta distinción resulta sustancial ya que a partir de los átomos cabeza se puede extraer importante información espectroscópica, lo cual resulta determinante en la comprensión de las conformaciones, reactividad y mecanismos de reacción.⁵

Los 1,3-heterociclos fusionados con benceno **1** han sido estudiados profundamente desde comienzos del siglo XX. Sin embargo, se ha puesto mucha menos atención en sus contrapartes parcialmente saturadas **2**. El intenso estudio de los heterociclos aromáticos se debe al hecho de que los materiales de partida para su síntesis han estado disponibles industrialmente desde fines del siglo XIX. En contraste, los insumos para la síntesis estereoespecífica de los heterociclos cicloalcanofusionados relacionados, se han preparado con cierta dificultad y no se encuentran disponibles comercialmente, Figura 0.1.⁵⁻⁷

La síntesis de 1,3-heterociclos de cinco miembros fusionados **3** es de gran interés debido a que investigaciones realizadas sobre este tipo de derivados sintéticos han demostrado su actividad como anti-micobacteriales,⁸ inmunomoduladores,⁹ anti-convulsionantes¹⁰ y anti-fúngicos.¹¹ Asimismo, desde organismos marinos se han podido aislar diferentes compuestos estructuralmente más complejos, como las aplysinopsins **4a** (Figura 0.2), para las que a lo largo de más de 30 años de investigación se han informado actividades citotóxicas contra células cancerosas e incluso

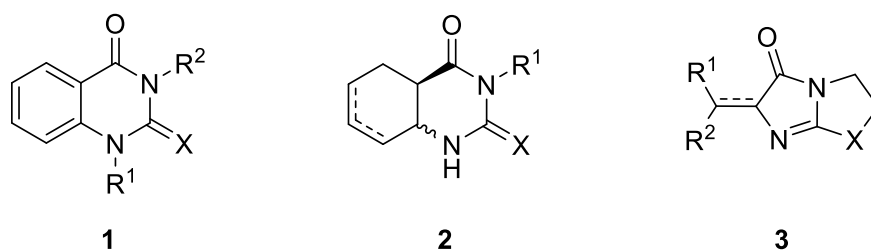


Figura 0.1: 1,3-heterociclos de seis miembros benzoderivados **1** y parcialmente saturados **2**, heterociclos de cinco miembros análogos **3**

interacciones con neurotransmisores con potencial actividad como antidepresivos.¹² Tal es el interés sobre este tipo de compuestos que ya se han diseñado análogos sintéticos a las estructuras naturales,¹³ los cuales se explicitan en la Figura 0.2.

Por otra parte, se conoce que la incorporación de átomos de flúor, o grupos fluorados, a pequeñas moléculas orgánicas puede otorgarle propiedades peculiares, principalmente desde el punto de vista de la química medicinal.¹⁴ La sustitución por grupos fluorados afecta las funciones de un principio activo, debido a cambios en la lipofilicidad, biodisponibilidad, estabilidad química, reactividad metabólica o la unión a un receptor.¹⁵ Estudios recientes sobre el imidazolin-indol fluorado **5** han demostrado que la incorporación de un átomo de flúor como sustituyente cumple un rol estructural fundamental en su actividad antimicrobiana.¹⁶

Las aplicaciones de los diaza 1,3-heterociclos no se limita solamente al área biológica; por ejemplo, algunas sales de imidazolininas **6** se pueden emplear como surfactantes para su uso como detergentes de lavado.¹⁷

Por otro lado, estas estructuras suelen ser buenos cromóforos, y sus propiedades fotoquímicas resultan de interés en otras áreas de la ciencia. Un caso ejemplar es el del cromóforo de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) **7**, que es una herramienta muy usada en biología molecular y celular, como así también en medicina, pues la GFP es un marcador biológico de gran estabilidad que incluso se puede usar en sistemas vivos.¹⁸ En los últimos años se han realizado numerosas publicaciones en relación a éste biomarcador. Tal es el interés sobre sus propiedades que se han diseñado análogos sintéticos al cromóforo **7**, que además han sido aplicados a la detección de ADN.¹⁹

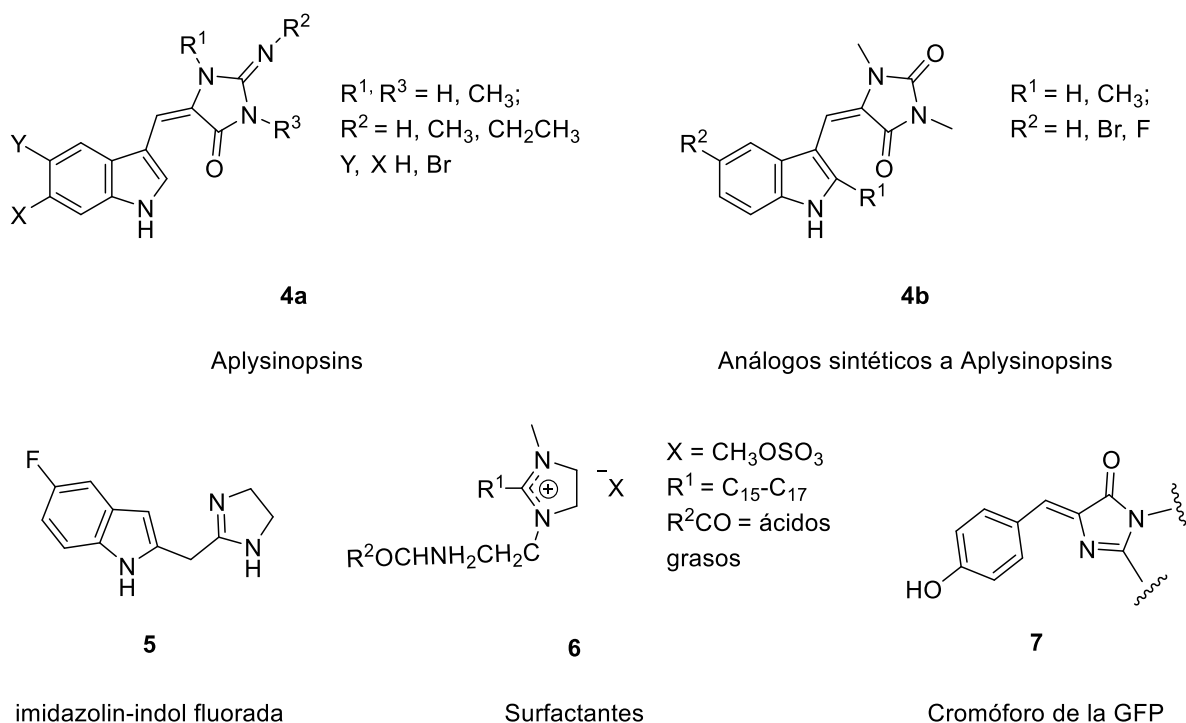


Figura 0.2: Estructura química: de Aplysinopsins **4a** aislados de organismos marinos, análogos sintéticos a los mismos **4b**, de un imidazolin-indol con actividad antimicrobiana **5**, de surfactantes derivados de imidazolininas **6**, del cromóforo de la GFP **7**

Se conoce que el cromóforo **7** fuera del barril- β de la GFP presenta diversos mecanismos de desactivación de fluorescencia en solución. Es por ello que al indagar aún más en sus propiedades fisicoquímicas se pueden encontrar estudios donde se han inmovilizado análogos a **7** en estructuras rígidas como *Metal Organic Frameworks* (MOFs), emulando así el interior de la proteína. De este modo, se logra inhibir aquellos mecanismos de relajación no-radiativos y además, modificar la emisión de un cromóforo dependiendo de la morfología del MOF.^{20,21}

Por lo mencionado anteriormente se han desarrollado numerosas vías de síntesis de 1,3-heterociclos, algunas de las cuales y, en particular para la obtención de derivados bencilidenos, son muy complicadas e invariablemente requieren el uso de catalizadores como rodio,²² iridio,²³ paladio²⁴ e incluso algunos más complejos como hidrotalcitas.²⁵

Actualmente la comunidad científica procura que los procesos de síntesis sean lo más eco-amigables posibles, y para ello se puede referenciar a los doce principios de la **química verde**, por los cuales es posible calcular diferentes parámetros que permiten evaluar cuán nocivo es un proceso químico. Algunos de estos índices son la *economía del átomo*, *factor-E*, *intensidad de masa*,

entre otros. Estos parámetros constituyen una herramienta post-sintética para la evaluación de una preparación orgánica, basándose en el rendimiento, seguridad, costos y procesos de purificación. De este modo, se puede discernir entre diferentes procedimientos que se enfocan en un mismo objetivo.^{26,27}

Una metodología de síntesis química amigable con el medio ambiente es la Síntesis Asistida por Microondas (*Microwave Assisted Organic Synthesis*, MAOS). Esta técnica ha ganado una gran relevancia en los últimos años debido a su fácil implementación y grandes beneficios. Las reacciones de síntesis llevadas a cabo en un reactor de microondas reducen drásticamente los tiempos de reacción, de horas a minutos, como así también reduce las reacciones colaterales, mejorando los rendimientos y la reproducibilidad.²⁸ Por estos motivos, se empleó esta metodología de síntesis para la gran mayoría de las reacciones llevadas a cabo en este trabajo de tesis.

OBJETIVOS GENERALES

Sintetizar familias de 1,3-heterociclos a partir de reactivos sencillos y económicos, enfocándose principalmente en aquellos derivados fluorados. En los procesos de síntesis, se pretende estudiar y proponer mecanismos de reacción para su formación y así comprender la reactividad de los sustratos que llevarán a la formación de estas moléculas.

De los compuestos sintetizados, se desea estudiar sus propiedades, lo cual incluye el estudio de algunas de sus actividades biológicas como así también sus propiedades fotoquímicas. En cuanto a sus actividades biológicas, se realizarán distintos ensayos para conocer su potencial antioxidante. Además, se llevarán a cabo estudios microbiológicos de algunos de los compuestos sintetizados con el propósito de descubrir si los mismos poseen algún tipo de actividad, como por ejemplo bacteriostática o bactericida. Por otro lado, respecto a sus propiedades fotoquímicas se pretende estudiar los procesos de isomerización existentes en las distintas moléculas; lo cual resulta interesante debido a que estas estructuras presentan potenciales aplicaciones en el desarrollo de motores moleculares. Continuando con las propiedades fotoquímicas, se pretende investigar el comportamiento fotofísico de estos compuestos con otras estructuras más complejas, como ADN y MOFs.

Página en blanco

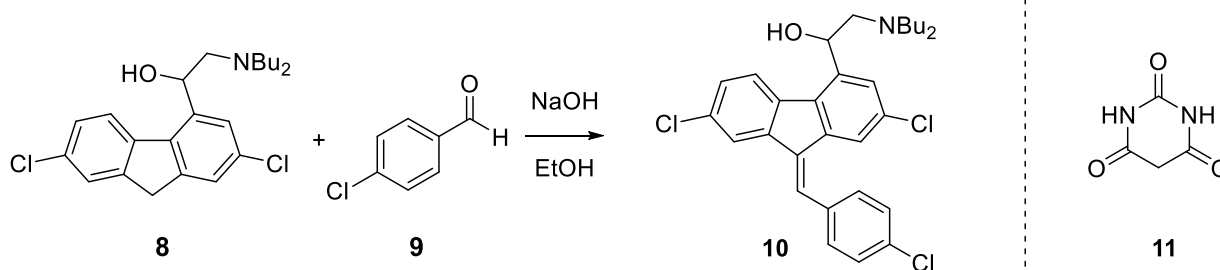
Capítulo 1

Síntesis y caracterización de benciliden
imidazolonas e imidazotiazolonas

Página en blanco

1.1 INTRODUCCIÓN

En 1898, el químico alemán Emil Knoevenagel publicó una reacción de síntesis entre un aldehído y derivados de CH_2XY (donde X e Y son grupos carbonilo o éster). En este proceso se emplea una base orgánica para generar un carbanión capaz de actuar como nucleófilo, que luego por deshidratación genera un enlace α - β insaturado respecto al grupo carbonilo.²⁹ Doce años más tarde, desde otra universidad alemana Oskar Doebner publicó una modificación a esta síntesis para producir una segunda decarboxilación-eliminación de manera concertada.³⁰ Estos procedimientos sintéticos, conocidos en forma general como **condensación de Knoevenagel**,³¹ han sido la base para el diseño de numerosos compuestos descritos en la literatura.^{32,33} Además, algunas sustancias de uso comercial se sintetizan siguiendo este mecanismo; a modo de ejemplo se pueden citar el fármaco antipalúdico *coartem* **10**³⁴ (Esquema 1.1) o el ácido barbitúrico **11**³⁵ que es empleado como estructura base de numerosos derivados sintéticos con actividad farmacológica.³⁶



Esquema 1.1: (izq.) síntesis del *coartem* **10**; (der) estructura del ácido barbitúrico **11**

En este capítulo se aplicará la ruta sintética propuesta por Knoevenagel para la síntesis de fenil metilen hidantoínas (PMHs) **12** y fenil metilen tiohidantoínas (PMTBs) **13**. Posteriormente, se continuará con la derivatización de los compuestos azufrados, las PMTBs, re-funcionándolos, generando así biclos fusionados **14**. Estas tres familias de compuestos 1,3-diaza heterociclos, derivados de hidantoína y 2-tiohidantoína, se ilustran en la Figura 1.1.

La síntesis de estos compuestos se llevará a cabo mediante Síntesis Asistida por Microondas (MAOS). Esta técnica resulta ser no-convencional ya que el calentamiento por microondas puede sustituir al calentamiento a reflujo; presentando diferentes ventajas, como por ejemplo la obtención

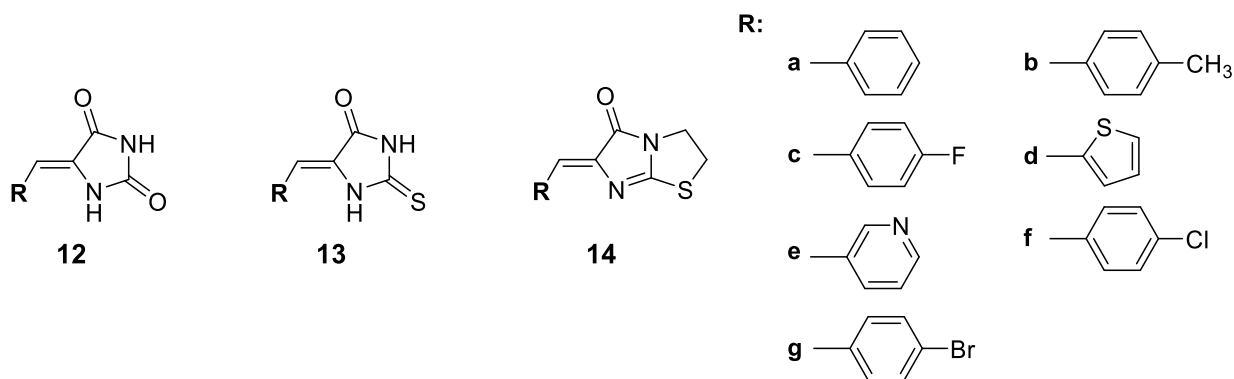


Figura 1.1: familias de 1,3-diaza heterociclos sintetizados

de muy buenos rendimientos en menores tiempos de reacción. Además, se puede tener un control muy preciso de la temperatura, garantizando una mejor reproducibilidad en las reacciones.³⁷ Desde el punto de vista sintético, se trabaja en condiciones de reacción más suaves que las descritas previamente en literatura, con menores consumos energéticos. De esta manera, optimizando el sistema, se logran muy buenas selectividades hacia los productos deseados.³⁸ Al mismo tiempo, esta técnica ha demostrado que su escalado a una producción en gramos es posible, lo cual siempre ha sido una dificultad al escalar los procedimientos del laboratorio a la industria.³⁹

Para la síntesis de estos compuestos se emplea como reactivo de partida los 1,3-diaza heterociclos de hidantoína **15** y 2-tiohidantoína **16** indicados en la Figura 1.2. Estos compuestos están disponibles comercialmente ya que, desde el descubrimiento de **15** en 1861 por Adolph Baeyer,⁴⁰ se han empleado como precursores sintéticos de α -aminoácidos,⁴¹ como así también han sido la base de la síntesis de nuevos compuestos.¹³

Existe un gran interés por estas estructuras ya que se emplean en la industria farmacéutica, por lo cual se pueden encontrar numerosos trabajos de síntesis eco-amigables en relación a estos reactivos.⁴²⁻⁴⁴ Asimismo, algunas estructuras derivadas de hidantoína **15** han demostrado ser muy buenos absorbentes de radiación UVA (320-400 nm) y UVB (290-320 nm).⁴⁵

Cabe destacar que el anillo de hidantoína por sí mismo no presenta ninguna actividad biológica relevante, pero aquellas con sustituyentes en el C5 han encontrado su lugar en la química medicinal.⁴⁶ Uno de los derivados más prominentes y conocidos es la 5,5-difenilhidantoína, también conocida como fenitoína **17**, recomendado por Merrit y Putnam para el tratamiento de epilepsia en 1938, y luego aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*).⁴⁷ Por otro lado, un derivado de 5,5'-diaril-2-tioximidazolin-4-ona **18** ha demostrado poseer una elevada afinidad de unión al

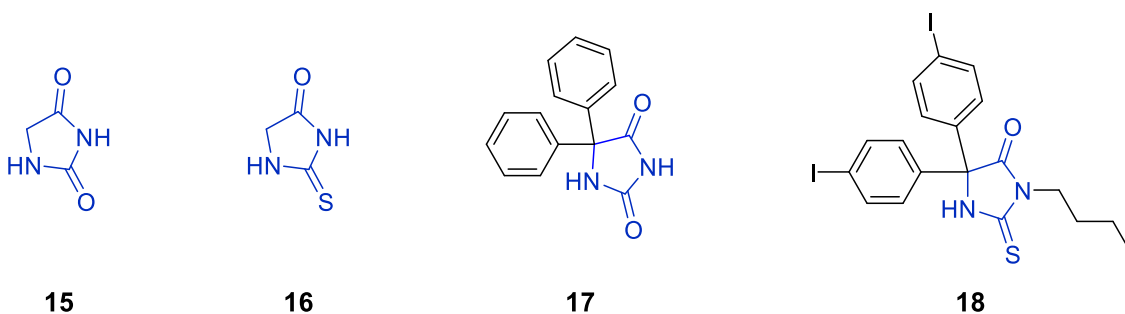


Figura 1.2: hidantoína **15**, 2-tiohidantoína **16**, fenitoína **17** y derivado de 5,5'-diaril-2-tiohidantoína **18**

receptor cannabinoide tipo 1 (CB₁),⁴⁸ lo cual despierta una potencial aplicación en el uso terapéutico para el tratamiento de desórdenes motores, como la enfermedad de Parkinson.⁴⁹

En el desarrollo de posibles principios activos es imprescindible la correcta y amplia caracterización de los compuestos, no sólo en sus propiedades sino también en sus características estructurales. Para ello se hace uso de un gran número de técnicas espectroscópicas, sin embargo, la que ha contribuido notablemente en la determinación estructural es la difracción de rayos X de mono-cristal, pues la estructura cristalina de un compuesto aporta información detallada a nivel molecular de una sustancia química, la cual no se puede obtener por otras técnicas. De este modo, se puede conocer sobre los aspectos estereoquímicos, los cuales poseen un rol fundamental en los estudios de estructura-propiedad tanto en química como en biología molecular.⁵⁰

En este caso, al tratarse de compuestos orgánicos los cristales que se analizan se denominan **cristales moleculares**, los cuales se caracterizan por estar empaquetados acorde a momentos dipolares y fuerzas de dispersión. En este sentido, resulta posible relacionar cómo las interacciones moleculares afectan al empaquetamiento,⁵⁰ por lo que al final de este capítulo nos adentraremos brevemente en la química del estado sólido al analizar las estructuras cristalinas de algunos de los compuestos sintetizados.

Página en blanco

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Sintetizar familias de fenil metilen hidantoínas (PMHs) y fenil metilen tiohidantoínas (PMTBs) a partir de diferentes aldehídos.
- ii) Refuncionalizar las fenil metilen tiohidantoínas generando bicíclos fusionados con diferentes sustituyentes en el anillo aromático.
- iii) Estudiar los mecanismos de reacción de las síntesis llevadas a cabo.
- iv) Explorar las mejores condiciones de síntesis asistida por microondas considerando aquellas alternativas que resulten más eco-amigables.
- v) Caracterizar por difracción de rayos X de mono-cristal los compuestos **12(a-c)**, **13(a-c)** y **14(a-c)**, y de este modo analizar las diferencias estructurales de las mismas.

Página en blanco

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Benciliden imidazolidinonas

Algunos de los compuestos listados en la Figura 1.1 ya han sido publicados,⁵¹ pero su síntesis se realizó por metodologías convencionales involucrando varios pasos sintéticos, requiriendo además días de calentamiento a reflujo. Es por ello que en este trabajo de tesis se optó por realizar la síntesis de diferentes PMHs y PMTHs mediante el uso de un equipo de microondas *Anton Paar monowave 300*. De este modo, se optimizaron las mejores condiciones de síntesis trabajando primeramente con las moléculas más simples, **12a** y **13a**, para luego sintetizar otros derivados.

La síntesis informada por Thenmozhiyal *et al.*⁵¹ para el compuesto **12a** involucra un gran número de pasos. Primero es necesario disolver la hidantoína en agua a 70 °C, ajustando el pH a 7 con bicarbonato de sodio, luego se incorpora dietanolamina incrementando la temperatura a 90 °C para así adicionar el aldehído en una solución alcohólica, y finalmente se mantiene con agitación a reflujo (120 °C) por 5-10 horas alcanzando rendimientos entre el 50 y 70 %. Partiendo de las mismas condiciones se procedió a realizar la reacción de síntesis de **12a** por microondas, y se observó que el rendimiento de la reacción aumentaba a medida que se eliminaban disolventes respecto a la síntesis convencional, como se representa en la Figura 1.3. De este modo, la síntesis de estos compuestos a través de esta metodología resulta ser más eco-amigable.

Para evaluar cuán eficiente es un proceso químico existen diversas métricas que se pueden emplear de manera sencilla, y cada una de ellas permite analizar las distintas alternativas planteadas desde una perspectiva diferente. Uno de estos parámetros es el factor ambiental, conocido como **factor-E** (*E-factor, environmental factor*) el cual se enfoca en la relación en masa de residuos generados respecto a los productos finales, como se indica en la Ecuación 1.1.²⁶

$$\text{Factor-E} = \frac{\text{g de residuos}}{\text{g de producto}} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

A partir de las reacciones realizadas por las distintas metodologías indicadas en la Figura 1.3 se puede apreciar que, debido al aumento en los rendimientos al ir eliminando disolventes, el Factor-E disminuye en más de quince veces, generándose sólo 4,9 g de residuos por cada gramo de producto. Del mismo modo, al comparar la *metodología 5* (Figura 1.3) con la síntesis convencional de **12a**,⁵¹ se

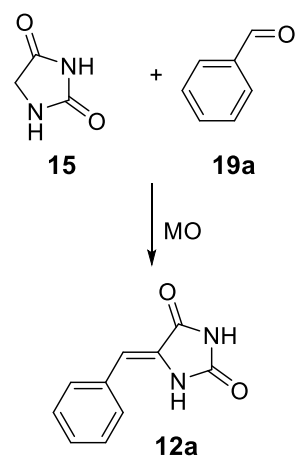
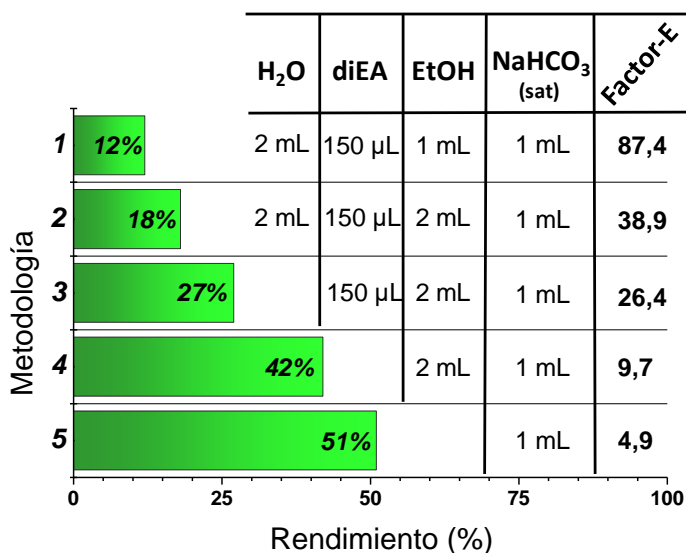
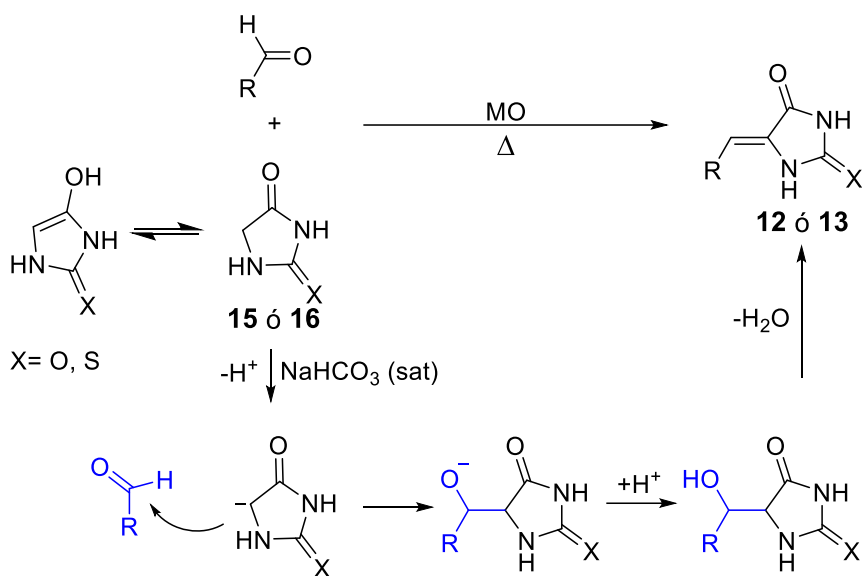


Figura 1.3: Rendimientos de **12a** bajo diferentes condiciones de síntesis por microondas y su Factor-E

puede destacar que si bien el rendimiento informado es mayor al obtenido mediante síntesis por microondas (71 %), debido al gran número de pasos y co-solventes adicionados, su Factor-E resulta ser de 14,6, lo cual indica que se generan aproximadamente 10 g más de residuos por cada gramo de producto sintetizado. En este punto resulta importante remarcar que no sólo se generan menos residuos, sino que también se disminuyen drásticamente los tiempos de reacción, lo cual no está contemplado en el Factor-E, pero sí en otras métricas como por ejemplo el **perfil del proceso** o **análisis del ciclo de vida** (*Life Cycle Analysis, LCA*).²⁶

Cabe destacar que la adición de una base, en este caso el bicarbonato de sodio saturado, es esencial para que la reacción se desarrolle. Como se mencionó anteriormente, en la condensación de Knoevenagel es necesario generar un carbanión, y para esta reacción la activación se produce mediante el C- α al carbonilo, como se explicita en el mecanismo presentado en el Esquema 1.2. De hecho, al comparar la variación de pH, antes y después de la irradiación con microondas, se puede apreciar que desciende de 11 a 7, indicando el consumo de la base.

Una vez establecido el medio de reacción para la síntesis por microondas, se dio continuidad a la búsqueda de las mejores condiciones variando los tiempos y temperaturas de reacción. Para ello se realizaron una serie de reacciones por microondas de **12a** y **13a**, determinando los rendimientos mediante espectroscopía UV-Vis, empleando curvas de calibración.



Esquema 1.2: mecanismo de Knoevenagel para la formación de los compuestos **12** y **13**

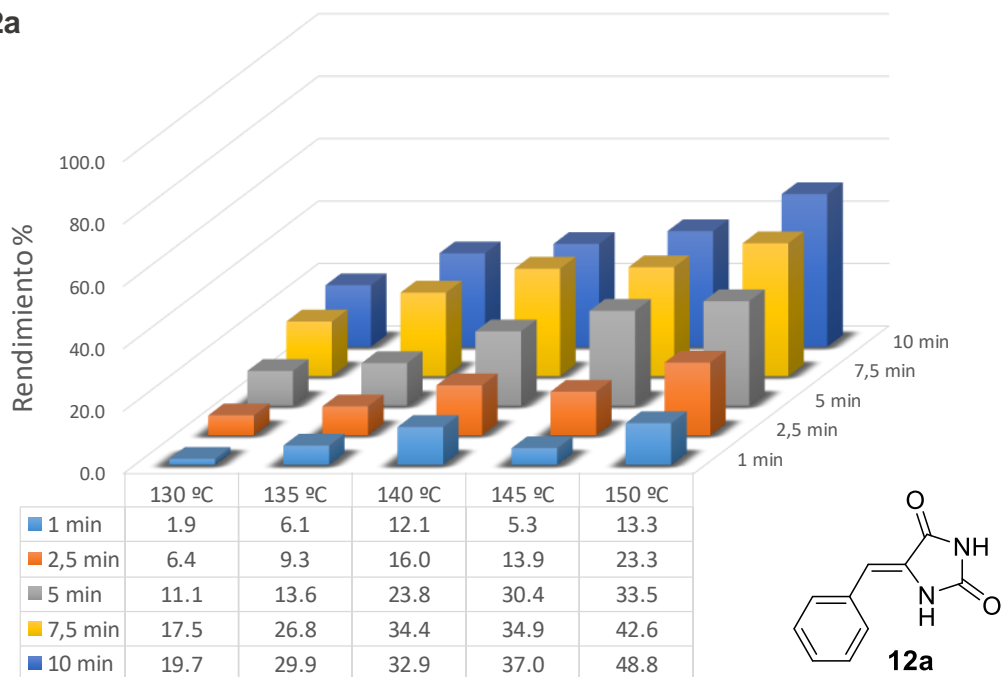
De los resultados representados en la Figura 1.4, para cada molécula, se puede apreciar que los rendimientos en las condiciones ensayadas son mayores para la estructura azufrada que para la oxigenada, obteniendo un rendimiento máximo del 96 y 49 %, respectivamente. Para el compuesto **12a** sería necesario evaluar otras condiciones a mayores temperaturas y tiempos de reacción para determinar el rendimiento máximo, ya que se denota un aumento de la conversión a producto al aumentar tanto la temperatura como el tiempo de reacción. Sin embargo, a fines comparativos y de estudio de reactividad los resultados obtenidos nos permiten arribar a algunas conclusiones.

Analizando la reacción de síntesis desde el mecanismo de Knoevenagel, y a partir de los resultados obtenidos, se puede argumentar que la 2-tiohidantoína es más reactiva que su contraparte oxigenada ya que para una misma temperatura y tiempo de reacción, se obtiene una mayor conversión a producto partiendo desde el compuesto azufrado. Por ejemplo, a 130 °C y 10 min de reacción, los rendimientos para **12a** y **13a** son 20 y 85%, respectivamente. Esto es debido a que el fragmento tiourea en **13a** atrae la densidad electrónica más fuertemente que el fragmento urea en **12a**, lo cual se manifiesta en la acidez de los hidrógenos correspondientes al C-5 de ambos heterociclos, pues la 2-tiohidantoína (pK_a 8,5) es un poco más ácida que la hidantoína (pK_a 9,12).⁴⁶

Posteriormente, se sintetizaron una serie de derivados de estos compuestos, con sus análogos azufrados y oxigenados, partiendo de diferentes aldehídos. Los compuestos sintetizados se listan en la Figura 1.5, indicando el rendimiento de cada una de ellos. Cabe destacar que para los compuestos

halogenados **12(f-g)** y **13(f-g)** los rendimientos no fueron muy altos, por lo que resulta necesario optimizar los condiciones de síntesis por microondas.

12a



13a

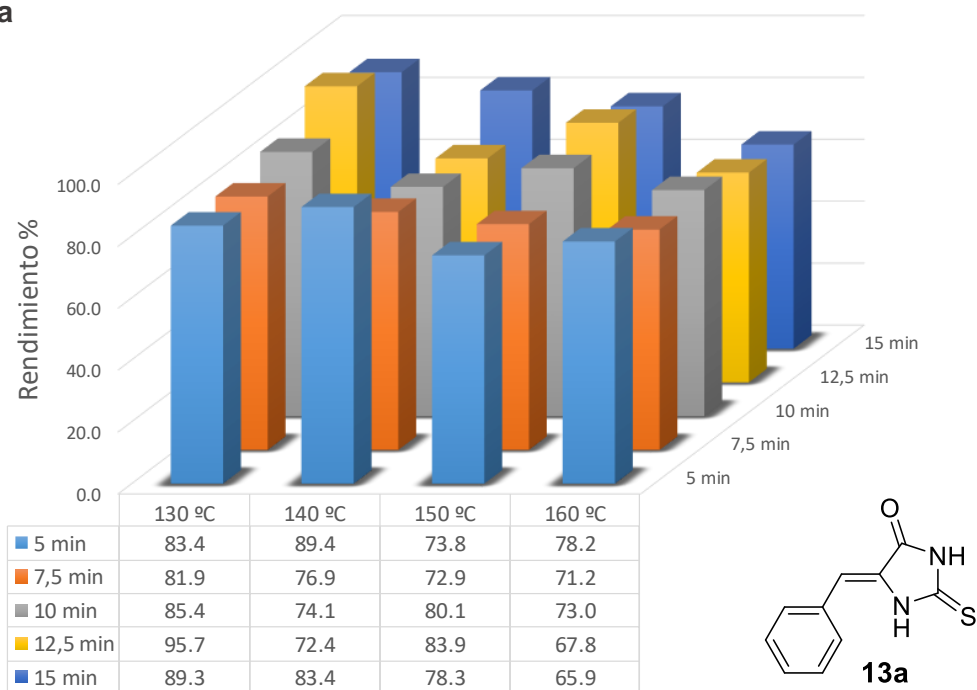


Figura 1.4: rendimientos calculados por UV-Vis de la síntesis por microondas para **12a** y **13a** bajo diferentes condiciones de reacción

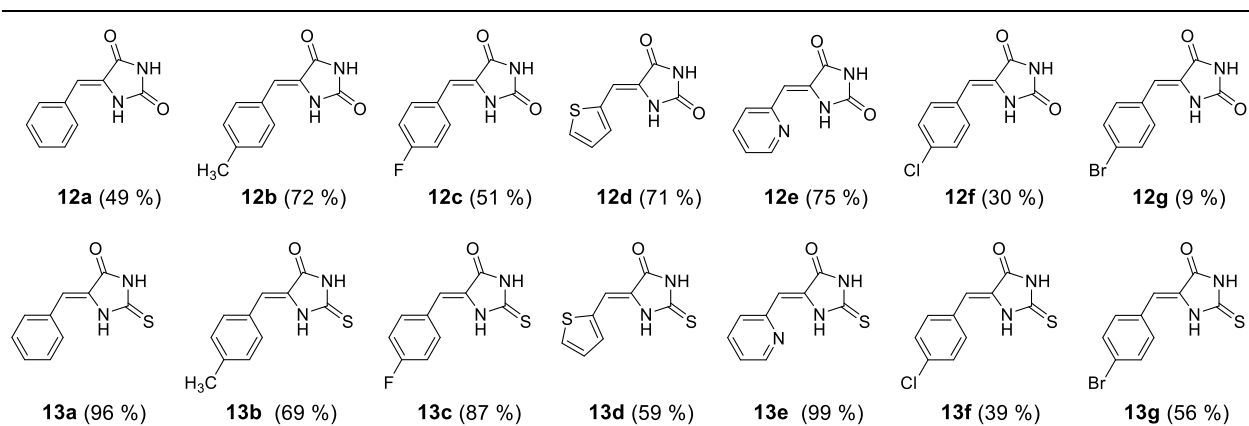


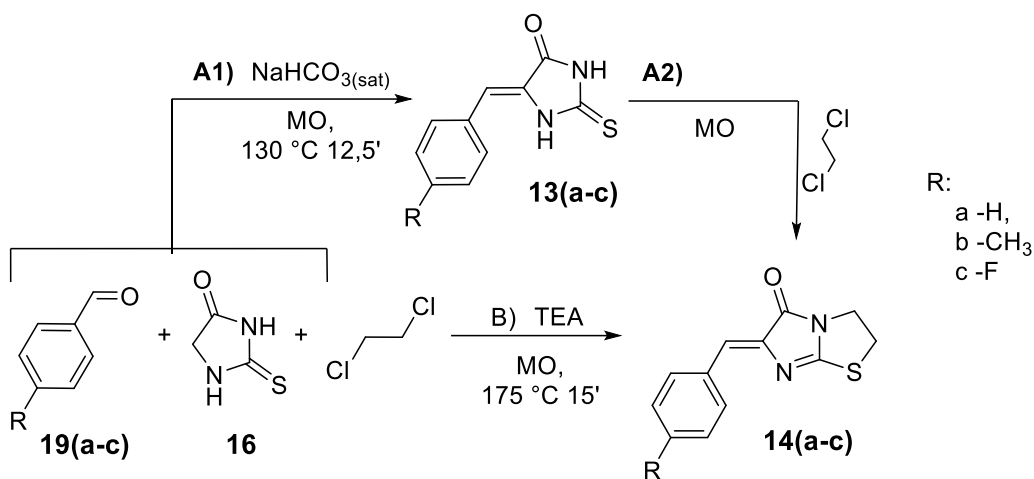
Figura 1.5: PMHs y PMTHs sintetizadas

Posteriormente, en el Capítulo 3 se muestran los resultados correspondientes a los estudios de actividad biológica para las moléculas que se presentan en la Figura 1.5. Principalmente se estudian aquellas con sustituyentes -H, -CH₃ y -F; de este modo se puede establecer al sustituyente -H como referencia respecto a los otros dos (-CH₃ y -F). Particularmente, se decidió trabajar con el sustituyente metilo debido a que es voluminoso y donador de densidad electrónica por efecto inductivo y, por otra parte, el sustituyente flúor que, en contraste con el metilo, resulta ser un tomador de densidad electrónica por efecto inductivo. Además, debido a las peculiaridades del átomo de flúor mencionadas previamente, resulta aún más interesante el estudio de moléculas con este tipo de sustituyente.

1.3.2 Benciliden imidazotiazolonas

A posteriori, se trabajó con las moléculas azufradas para re-funcionalizarlas. El objetivo inicial consistió en sustituir el N-3 del heterociclo de 2-tiohidantoína; pero la reactividad del átomo de azufre, debido a su polarizabilidad y capacidad de formar tautómeros, resultó en la formación de un biciclo fusionado **14**. En el Esquema 1.3 se representan las distintas rutas sintéticas ensayadas para obtener la benciliden imidazotiazolina de interés **14**. Dichas rutas fueron exploradas previamente en nuestro laboratorio para el compuesto **14a**,⁵² por lo que en este trabajo se planteó obtener nuevos derivados del mismo, mejorando la síntesis y evaluando los rendimientos. Asimismo, se llevaron a cabo reacciones auxiliares para comprender el mecanismo de reacción.

Se realizaron una serie de reacciones asistidas por microondas con la molécula más simple **14a**, siguiendo tanto la ruta **A** como **B**. Mediante CG-EM se monitoreó la conversión a productos al



Esquema 1.3: rutas de síntesis de las benciliden tiazolonas **14(a-c)**

modificar las cantidades estequiométricas, como así también la naturaleza y la cantidad de la base adicionada.

De la ruta **A**, el paso **A1** se optimizó previamente como ya se describió, por lo que el foco de atención se centró en el paso **A2**. En primer lugar, se evaluó cómo es la reacción al reemplazar NaHCO_3 por TEA, y de los resultados se observó que ante un gran exceso de TEA la conversión a productos es baja, generándose un gran número de subproductos.

Por otro lado, cuando se trabajó con $\text{NaHCO}_3(\text{sat})$ se observó la presencia de un compuesto derivado de la hidrólisis de **14a**, el compuesto **20** ilustrado en la Figura 1.6. Este producto de hidrólisis se diferencia de otro descrito por Okada *et al*⁵³ donde se generan tioles, pero en nuestro caso se pudo apreciar por CG-EM una clara pérdida de agua, cuya fragmentación no sería factible si el producto fuese un tiol.

Por lo mencionado anteriormente, para disminuir la hidrólisis de **14a** se trabajó en un sistema acuoso formado por iguales proporciones de $\text{NaHCO}_3(\text{sat})$ y H_2O destilada (1 : 1). Como esta reacción resultó ser interesante en relación a la reactividad y estabilidad de estos compuestos heterocíclicos, se evaluaron las diferentes condiciones de síntesis por microondas siguiendo los productos de estas dos reacciones competitivas: la hidrólisis y la alquilación. Los resultados se representan en la Figura 1.6, y de los mismos se desprende que la formación del hidrolizado se incrementa más por un aumento de temperatura que por un incremento en los tiempos de reacción. Es por ello que, en este medio de reacción, las condiciones óptimas de síntesis para **14a** es 115°C durante 12,5 min, obteniéndose un rendimiento determinado por CG-EM del 58 %.

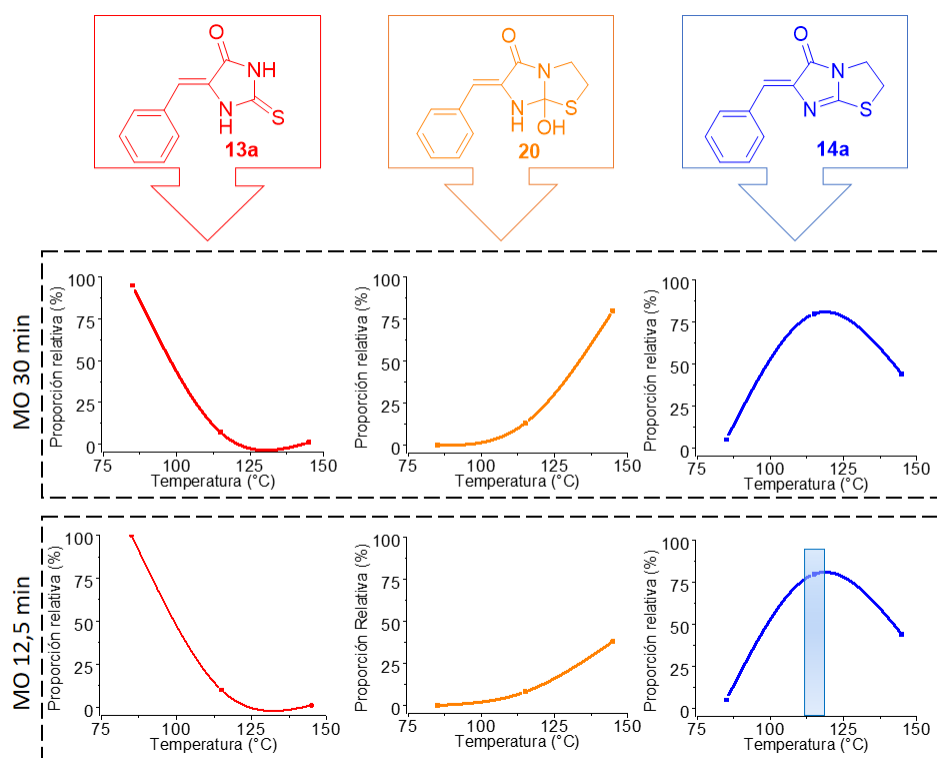


Figura 1.6: monitoreo de la síntesis de **14a** a partir de **13a**. Consumo del reactivo, hidrólisis y formación del producto deseado

Continuando con esta exploración, en este tipo de N,S-alquilaciones se ha observado que al trabajar con bases más fuertes, como hidróxido de sodio, se obtiene una mezcla de productos,⁵³ por lo que luego de discernir que la formación del compuesto hidrolizado **20** es menor al trabajar con TEA, en comparación con el NaHCO_3 en medio acuoso, se procedió a evaluar ambas vías de reacción que se presentan en el Esquema 1.3. Por este motivo, se realizaron curvas de calibración por HPLC a partir de los compuestos puros, los cuales se muestran en la Figura 1.7. De este modo, en la Tabla 1.1 se listan los rendimientos calculados para cada una de las reacciones desarrolladas por medio de las diferentes rutas sintéticas (**A** y **B**, Esquema 1.3).

De los resultados obtenidos se desprende que la síntesis en un solo paso (ruta **B**, Esquema 1.3), no sólo incrementa los rendimientos de la conversión a productos, sino que además se obtiene una menor cantidad de subproductos. Por otro lado, se puede apreciar que el sustituyente del aldehído **19** produce una gran variación en los rendimientos de la reacción, por lo que resulta necesario explorar cuáles son las mejores condiciones de síntesis por microondas a fin de optimizar los rendimientos de **14b** y **14c**.

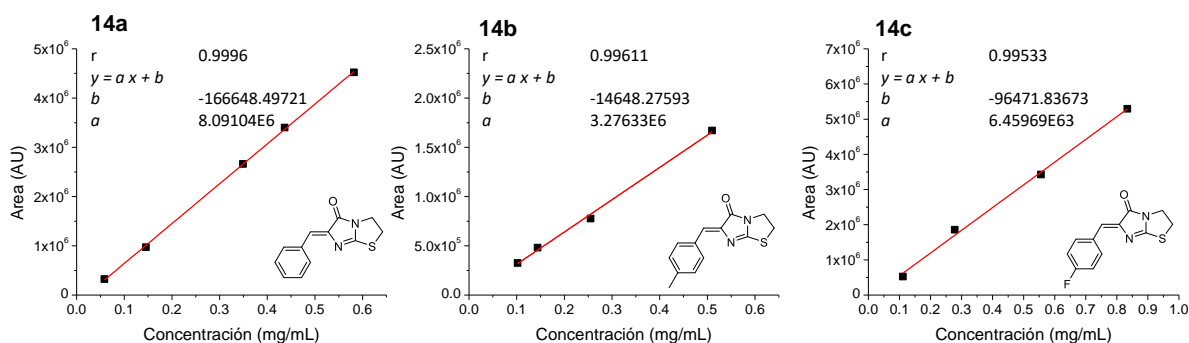


Figura 1.7: Curvas de calibración por HPLC de los compuestos **14a-c**

Tabla 1.1: rendimientos para la formación de **14a-c**

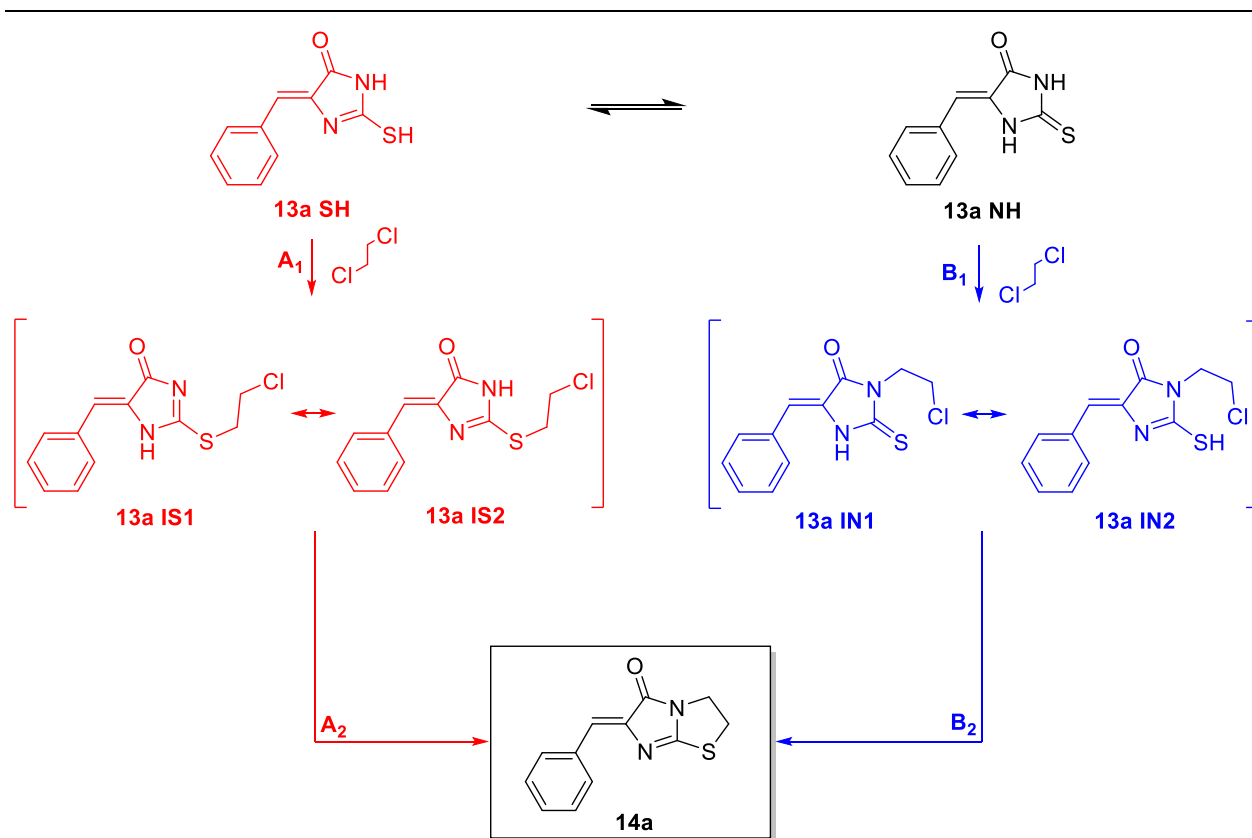
Compuesto	Rendimiento (%)	
	A	B
Ruta sintética		
14a	75	98
14b	15	35
14c	4	17

1.3.3 Análisis del mecanismo de reacción

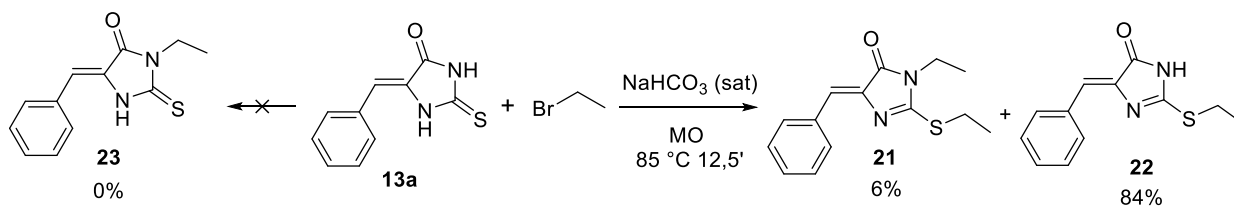
Es conocido que los benciliden 1,3-heterociclos como los correspondientes a la estructura **13** presentan tautomería que da lugar al equilibrio entre la forma tiona y tiol.⁵⁴ A partir de este análisis, se pueden plantear dos posibilidades para la formación del biciclo fusionado **14**. Una de ellas consiste en un primer ataque nucleofílico a partir del nitrógeno del heterociclo, y la segunda es a partir del átomo de azufre; tal como se ilustra en el Esquema 1.4.

Con el objetivo de elucidar el mecanismo, se planteó una reacción auxiliar a partir de **13a** y 1-bromoetano. En esta propuesta, la diferencia radica en el agente alquilante, pues el 1-bromoetano no puede dar lugar a la ciclización por no presentar un segundo halógeno como grupo saliente. Como se indica en Esquema 1.5, se obtuvieron dos productos de esta reacción: uno mayoritario (84 %) que posee un sustituyente tioetilo, y otro minoritario que incorpora dos sustituyentes etilo, uno sobre el átomo de S y otro sobre el N3; este último ya se había identificado previamente como una impureza en la síntesis de **14a** (compuesto **21**, Esquema 1.5).

Mediante espectroscopía de RMN-¹H se pueden diferenciar claramente los metilenos enlazados a nitrógeno de aquellos enlazados a azufre, pues los primeros se encuentran alrededor de 4 ppm mientras que los segundos a 3 ppm. En la Figura 1.8 se muestra un fragmento del espectro de RMN-¹H



Esquema 1.4: posibles mecanismos para la formación de **14a**



Esquema 1.5: productos de la reacción entre **13a** y 1-bromoetano

de los productos de esta reacción, demarcando los metilenos de diferente naturaleza química. Además, en la Figura 1.9 se muestran los espectros de masas de los mismos, donde se detectó en ambos compuestos un fragmento de $m/z=60$, correspondiente al radical catión $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}]^+$.

De los resultados obtenidos se puede confirmar que el mecanismo de reacción sigue la vía **A** del Esquema 1.4, es decir, el primer ataque nucleófilo se produce entre el tior y el 1,2-cloroetano, para luego ciclarse por un segundo ataque nucleófilo debido al par de electrones no enlazantes del nitrógeno. Conjuntamente, estas deducciones denotan la importancia de considerar la tautomería existente en este tipo de moléculas.

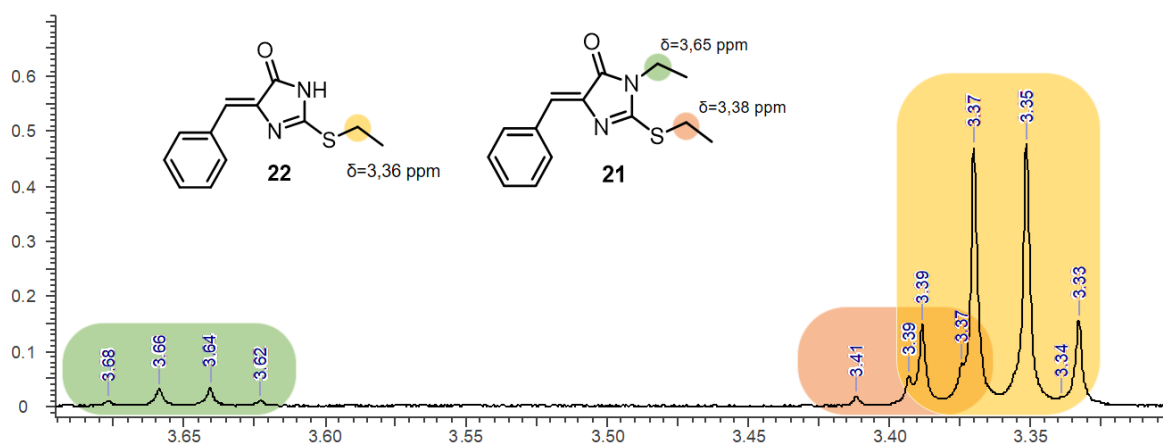


Figura 1.8: RMN- ^1H del producto de la reacción del Esquema 1.5

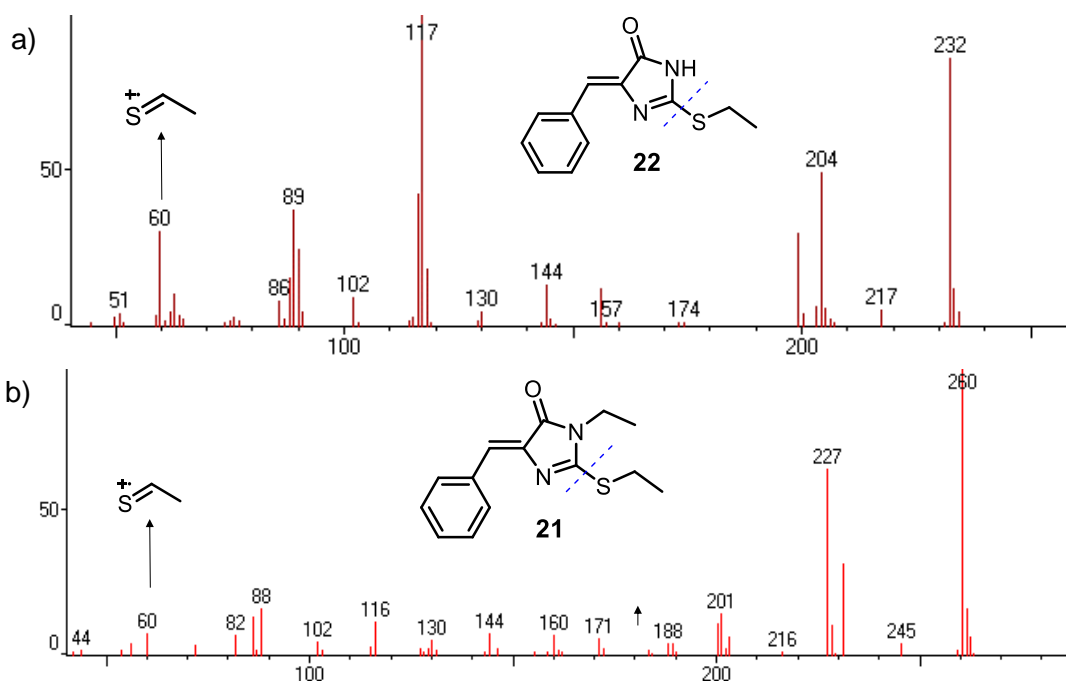


Figura 1.9: patrón de fragmentación del compuesto (a) **22** y (b) **21**

1.3.4 Caracterización de los cristales moleculares

Como se mencionó anteriormente, el análisis de un cristal por difracción de rayos X puede aportar valiosa información estructural de la muestra en estudio. Esta sección se desarrollará el análisis de las estructuras cristalinas de nueve de las catorce moléculas sintetizadas: **12(a-c)**, **13(a-c)** y **14(a-c)**, Figura 1.10. De este modo, en el diseño molecular se presentan tres sustituyentes distintos en la posición *para* del anillo aromático (**a**: -H, **b**: -CH₃, **c**: -F). Al mismo tiempo, se puede comparar la variación de un átomo de oxígeno en **12** por otro de azufre en **13**, como así también estudiar el cambio de hibridación de los átomos de azufre y N1 al generar el biciclo fusionado en **14**.

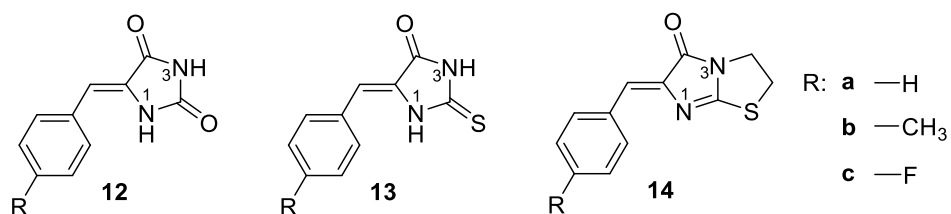


Figura 1.10: 1,3-heterociclos seleccionados para su estudio en fase sólida

Para observar la diferencia en los empaquetamientos entre las moléculas sintetizadas, se determinó su estructura cristalina por difracción de rayos X. Debido a que la estructura cristalográfica de algunas moléculas ya estaban publicadas (**12a**, **12c**, **13a**),⁵⁵⁻⁵⁷ se trabajó con estas estructuras ya descritas y se determinaron seis estructuras cristalinas no informadas hasta el momento (Figura 1.11).

En primer lugar, se puede apreciar innegablemente la configuración del isómero *Z* para todas las moléculas estudiadas. Denotando también una elevada planaridad en todas ellas, con ángulos de torsión C4-C5-C6-C61 cercanos a 180°, como se detalla en la Tabla 1.2 y la Figura 1.12. Además, de este análisis se desprende que aquellas con el sustituyente fluorado en la posición *para* del anillo aromático presentan ángulos de torsión D₁ aún más cercanos a 180° que sus respectivos análogos hidrogenados y metilados.

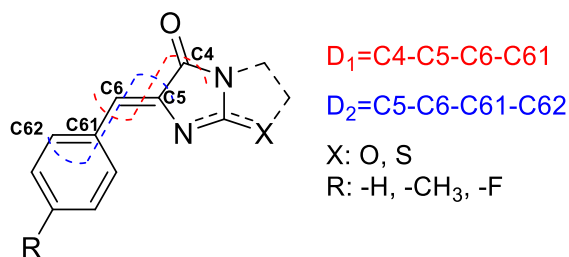


Figura 1.12: ángulo de torsión D1 y D2

Tabla 1.2: ángulos de torsión para las moléculas **12(a-c)**, **13(a-c)** y **14(a-c)**

R:	a) -H		b) -CH ₃		c) -F	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2
12	-175,54°	-159,30°	-175,70°	175,69°	-179,75°	-162,12°
13	-175,57°	-172,73°	-175,29°	175,73°	-177,38°	168,23
14	-177,30°	173,06°	177,59°	-171,11°	-178,79°	177,33°

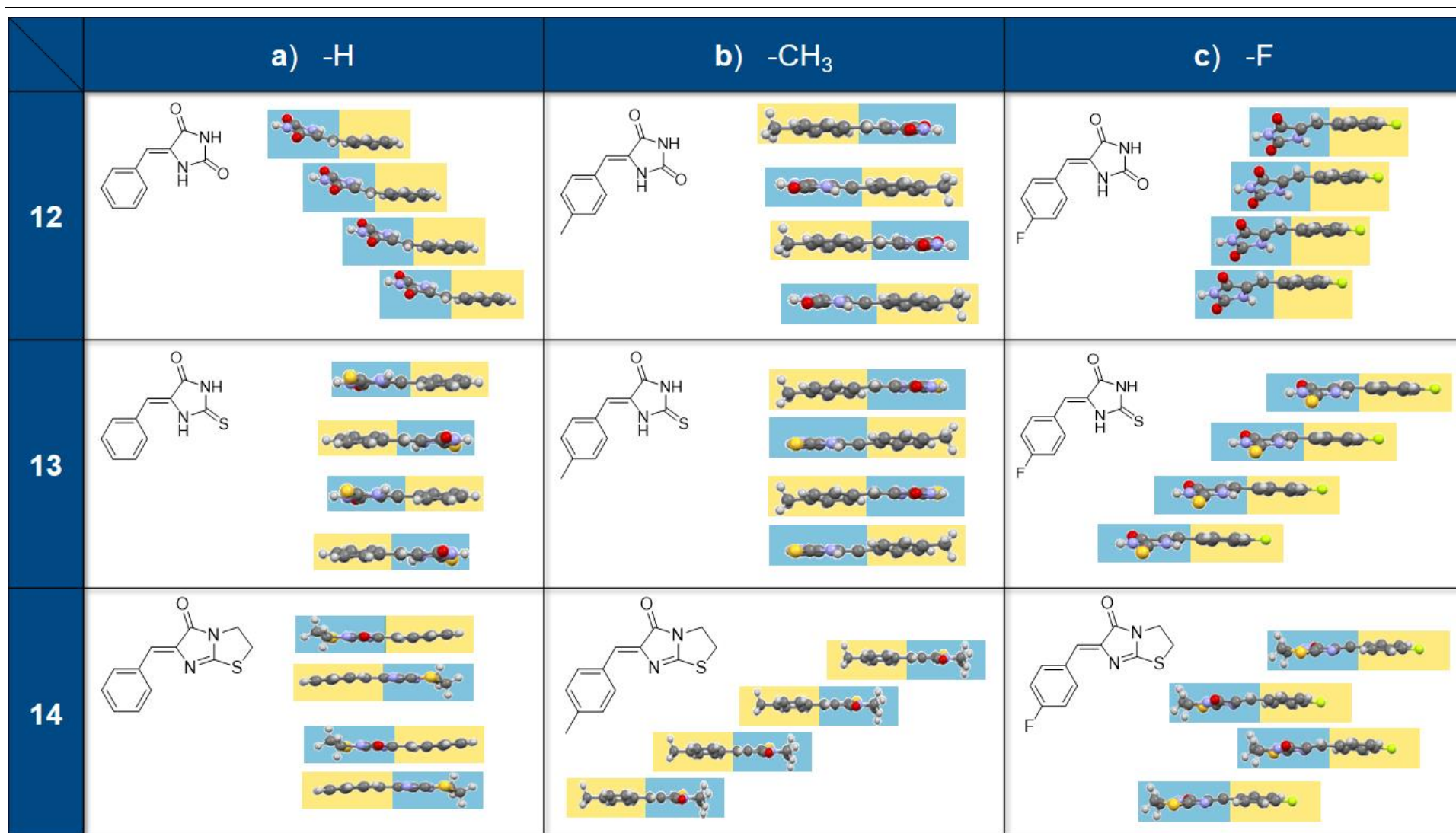


Figura 1.11: estructuras cristalinas de las moléculas **12(a-c)**, **13(a-c)** y **14(a-c)**. Los anillos aromáticos se resaltan en cuadros amarillos, mientras que los heterociclos en cuadros azules, para así remarcar el orden del empaquetamiento.

Para indagar respecto a las diferencias entre los empaquetamientos se puede analizar cómo son las densidades electrónicas de los grupos próximos entre sí, y a su vez considerar las distribuciones de densidad electrónicas estimadas a través de cálculos teóricos. En este sentido, resulta relevante considerar la influencia de los sustituyentes en el anillo aromático. Se conoce que cuando el sustituyente es un grupo donador de densidad electrónica (EDG, *electron donating group*), la misma se incrementa sobre el anillo aromático, lo cual producirá una aproximación de este fragmento con el heterociclo de la imidazolina deficiente en electrones. De lo contrario, cuando el sustituyente es un grupo tomador de densidad electrónica (EWG, *electron withdrawing group*), la misma es desplazada hacia el sustituyente, pudiéndose observar que los fenilos están más próximos entre sí debido a las interacciones π - π .⁵⁸ Este tipo de interacciones se esquematizan en la Figura 1.13.

En efecto, este tipo de interacciones se pueden observar claramente al comparar los compuestos **12a**, **12b** y **12c**. En **12b** al tener un grupo metilo (EDG) en el anillo aromático, produce que el empaquetamiento sea alternado; mientras que en **12c** con un átomo de flúor (EWG) los anillos aromáticos se encuentran dispuestos en un mismo eje. Este tipo de interacciones se explicitan más claramente en la Figura 1.14 para las moléculas **12b** y **12c**, en donde además se puede apreciar que la distancia de los centroides entre el heterociclo y el anillo aromático en **12b** es 3,567 Å y entre los anillos aromáticos en **12c** es 3,825 Å. Estos resultados evidencian las interacciones de Van der Waals para ambas moléculas, las cuales regulan el empaquetamiento.

Asimismo, al comparar **12a** con **13a**, donde la única variación es el cambio de un oxígeno por un átomo de azufre, el empaquetamiento cambia a una forma alternada, como se aprecia en la Figura 1.11. Esto se debe a que existen interacciones intermoleculares del tipo $S\dots S$, previamente descritas por Książek *et al.*⁵⁵ Estas interacciones $S\dots S$, junto con otras del tipo puente H, se representan en la Figura 1.15 para **13a**, contrastando con su análoga oxigenada **12a**.

Resulta interesante destacar que este tipo de interacciones $S\dots S$ también se pueden apreciar en **13b**, pero no así en **13c**. La diferencia radica en el átomo de flúor, el cual, debido a sus interacciones intermoleculares, juega un rol central en las propiedades de compuestos sólidos.⁵⁹ En este caso el átomo de flúor establece interacciones similares a puente H con otras moléculas,

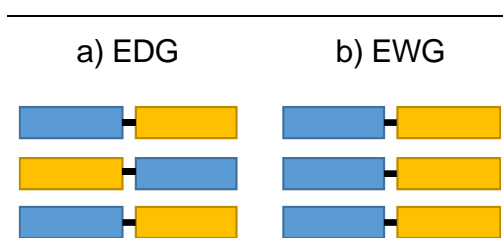


Figura 1.13: distintos tipos de empaquetamiento según el sustituyente en el anillo aromático: a) EDG; b) EWG.

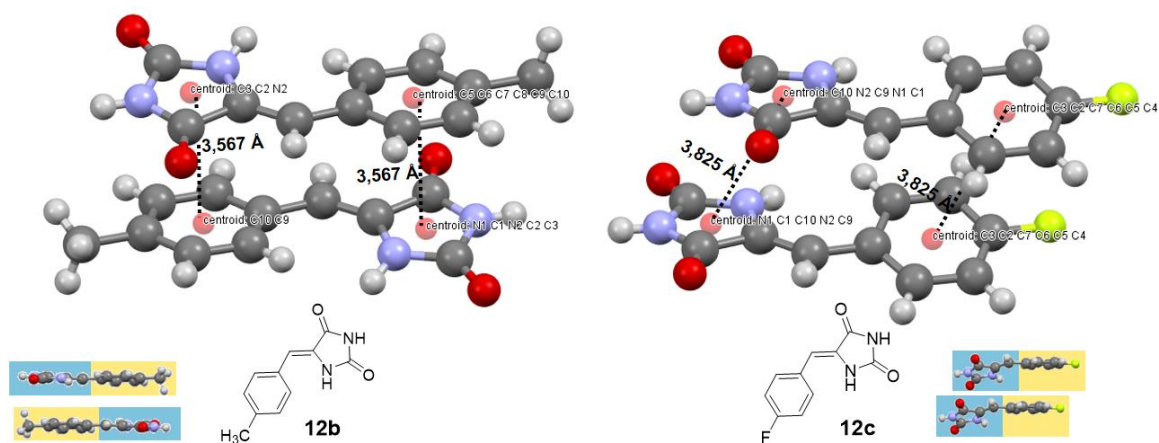


Figura 1.14: distancia entre los centroides de los ciclos empaquetados en las moléculas **12b** y **12c**

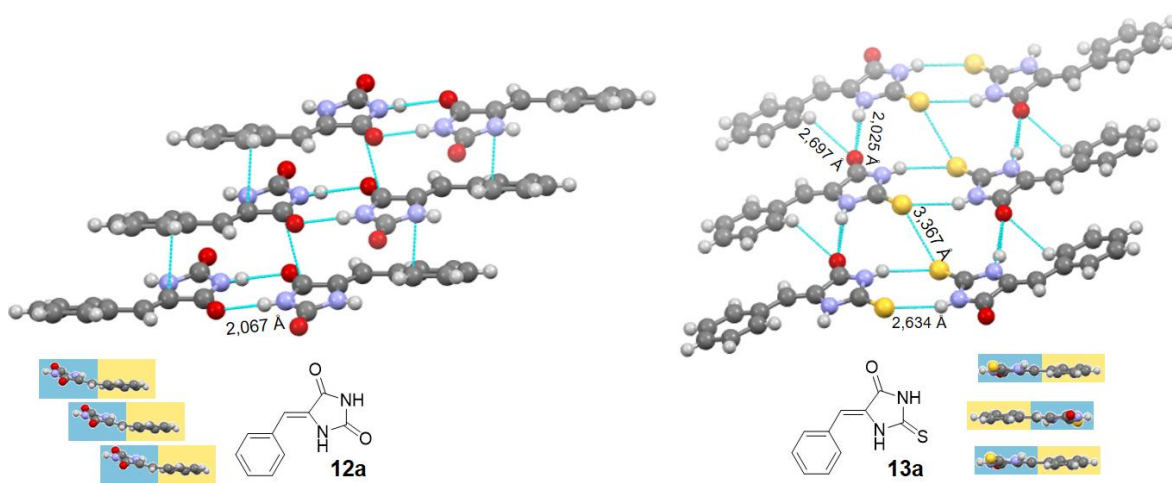


Figura 1.15: interacciones intermoleculares del tipo S...S y puente H para **12a** y **13a**

por lo que se propone que éstas no permiten la formación del puente S...S observados en **13a** y **13b**. En la Figura 1.16 se ilustran estas interacciones para la molécula **13c**, como así también para la contraparte oxigenada **12c**. En el primer caso se puede apreciar como el átomo de flúor establece dos interacciones tipo puente H, uno con el H vinílico y otro con el H en la posición *orto* del anillo aromático de otra molécula; mientras que para **12c**, también se observa este tipo de interacciones pero con el H *meta* del anillo aromático de otra molécula.

Por último, al analizar los compuestos ciclados **14(a-c)** se puede apreciar que, si bien el empaquetamiento entre ellos es distinto, éste a su vez es siempre alternado sin importar el sustituyente en el anillo aromático. Cabe destacar que en estas moléculas ya no existe la posibilidad de formar puente H con el átomo de azufre; pero sí se pueden apreciar algunos contactos que resultan interesantes. Principalmente en la molécula **14c**, Figura 1.17, se puede apreciar la interacción

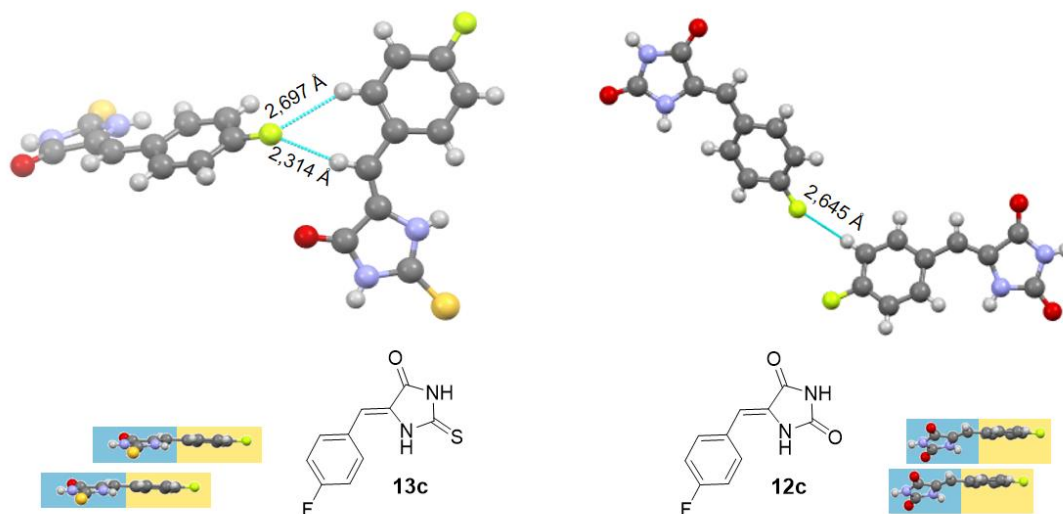


Figura 1.16: puente H formados a partir del átomo de flúor en las moléculas **12c** y **13c**.

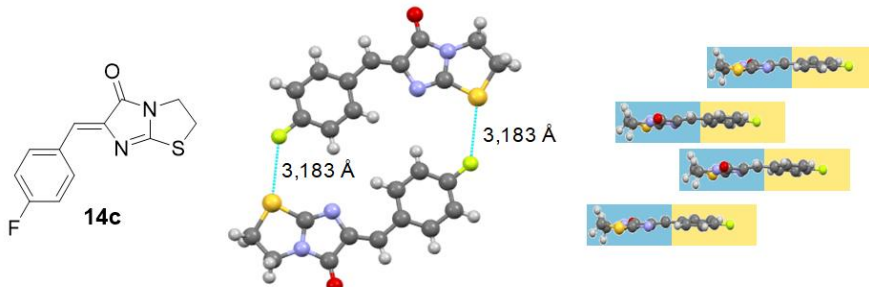


Figura 1.17: interacción entre el flúor y el azufre en **14c**

entre el flúor con el azufre, lo cual se debe a la elevada electronegatividad del flúor y la distribución anisotrópica de densidad electrónica sobre el azufre.

A partir de las estructuras cristalográficas se pueden explicar algunos aspectos vinculados con la reactividad de las moléculas. De la estructura **13a** publicada por Książek *et al.*⁵⁵ se determinó experimentalmente que el enlace N3-C2 es más largo que N1-C2. Mediante la resolución de los cristales moleculares de **13b** y **13c** se determinó que la misma tendencia se cumple al incorporar los sustituyentes $-CH_3$ y $-F$, como se ilustra en la Figura 1.18. Esta diferencia en las longitudes de los enlaces permite que en una reacción química las adiciones sean más favorecidas por el N3 que por el N1, lo cual es coherente con nuestros resultados, ya que en las reacciones de ciclización realizadas a partir de los compuestos **13(a-c)** siempre han tenido lugar entre el S y el N3. De hecho, las reacciones con 1-bromoetano también han resultado en 2,3-adiciones.

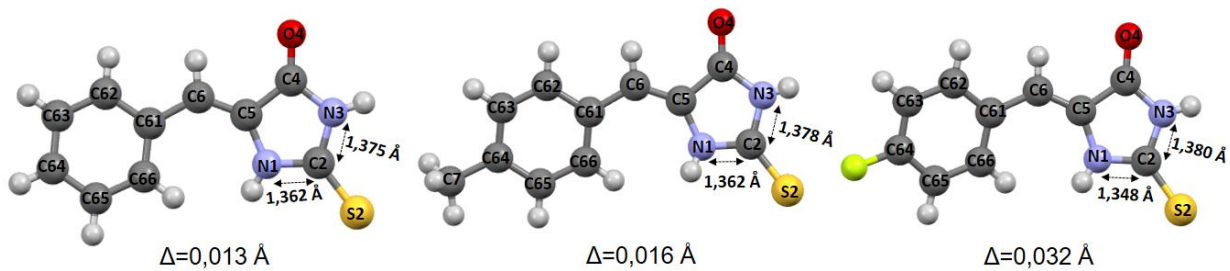


Figura 1.18: estructura cristalográfica de **13(a-c)** indicando la diferencia entre las longitudes de los enlaces N1-C2 y N3-C2

1.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se planteó sintetizar diferentes PMHs y PMTs, por lo que primeramente se exploraron diferentes medios de reacción en la síntesis por microondas de 5-bencilidenimidazolidin-2,4-diona **12a**. De este modo, se logró mejorar la metodología informada por Thenmozhiyal *et al.*¹⁰, disminuyendo drásticamente los tiempos de reacción, de días a minutos, reduciendo además el Factor-E de 14,6 a 4,9. A partir de estos resultados, se encontraron las mejores condiciones de temperatura y tiempo de irradiación de microondas para los compuestos **12a** y **13a**. Para el primero se obtuvo un rendimiento de 49 %, mientras que para el segundo los rendimientos fueron más altos, llegando al 96 %. Esta diferencia, como se explicó anteriormente, se debe a la mayor acidez del hidrógeno del C5 de la tiohidantoína **16** respecto a la hidantoína **15**.

Habiendo explorado la síntesis de **12a** y **13a**, se sintetizaron otros doce derivados de hidantoína **15** y tiohidantoína **16**. Los rendimientos para estos compuestos (**12b-g** y **13b-g**) son muy variados cuando se utilizan las condiciones evaluadas anteriormente, por lo que para optimizarlos resultaría necesario ajustar las condiciones de temperatura y tiempos de reacción para cada sustituyente en particular.

Posteriormente, se sintetizaron tres bicíclos fusionados con diferente sustituyentes arilo **14a-c**. Se comprobó experimentalmente el mecanismo de reacción y además se evaluaron dos vías de síntesis, resultando mejor la metodología *one-pot*. Esto último se debe a que, al disminuir la reacción competitiva de hidrólisis del producto deseado se lograron mejores rendimientos de reacción respecto a la *one-pot-two-pot*.

Por otra parte, se determinó la estructura cristalográfica de seis compuestos, las cuales no están publicadas hasta el momento. Se analizaron sus características fundamentales en estado sólido a partir del estudio de los cristales moleculares de **13a-c**, **14a-c** y **15a-c**. De los ángulos diedro se corroboró la planaridad de las moléculas, denotándose que aquellas con sustituyente fluorado presentan ángulos diedros más cercanos a 180°. Además, se analizaron las interacciones intermoleculares, observándose que el átomo de azufre presenta un papel preponderante al producirse puentes S...S, como así también se pudo apreciar una peculiar interacción entre el átomo de azufre con el de flúor en **14c**.

Por otro lado, al observar las distancias de los enlaces en los heterociclos **13a-c** se pudo determinar que en los tres casos la distancia del enlace N3-C2 es mayor que la del enlace N1-C2, lo cual contribuye al análisis de Książek *et al.*⁵⁵ al sugerir que debido a esta diferencia en las longitudes de enlace los ataques nucleofílicos son favorecidos por el N3, lo cual también pudo ser corroborado experimentalmente en este trabajo de tesis en las reacciones con 1-bromoetano. De este modo, el análisis de los cristales moleculares, contribuyó no sólo a la comprensión de los empaquetamientos, sino también a la reactividad molecular de las reacciones de síntesis planteadas en este capítulo.

1.5 SECCIÓN EXPERIMENTAL

1.5.1 Síntesis de benciliden imidazolonas e imidazotiazolonas

1.5.1.1 Metodología de síntesis

Todas las reacciones de síntesis se realizaron empleando un equipo de microondas Anton Paar Monowave 300 (Figura 1.19), con viales de borosilicato de 10 y 30 mL. En estas reacciones se varió las condiciones de temperatura y tiempos de reacción; pero cabe aclarar que en todas las síntesis se siguió el mismo protocolo y siempre con agitación magnética a 1200 rpm:

1. Calentar lo más rápido posible a 30 °C y agitar durante 30 segundos.
2. Calentar lo más rápido posible a la temperatura deseada y mantener esa temperatura durante el tiempo establecido.
3. Finalmente, enfriar a 45 °C.

En este método, la potencia de irradiación de microondas es variable y se ajusta en forma automática para alcanzar y mantener la temperatura deseada.



Figura 1.19: microondas Anton Paar monowave 300

1.5.1.2 Síntesis de Z-5-ariliden imidazolidin-2,4-dionas **12(a-g)**

Para la síntesis se agregaron los reactivos en el siguiente orden: (1^{ro}) hidantoína, (2^{do}) aldehído, (3^{ro}) bicarbonato de sodio saturado. En la Tabla 1.3 se resumen las mejores condiciones de síntesis exploradas para cada molécula de la familia **12(a-g)**.

Luego de la síntesis se agregaron 5 a 15 mL de agua destilada, dependiendo del vial que se empleara, dejando la mezcla por lo menos un día en refrigeración para la precipitación de los productos. Posteriormente se filtró y enjuagó el precipitado obtenido con agua destilada para remover los restos de hidantoína. En el caso que no se formara un precipitado, se extrajo con AcOEt : H₂O, recuperando la fase orgánica y se purificó por columna cromatográfica eluyendo con la siguiente mezcla de solventes de menor a mayor polaridad: n-hexano, diclorometano, etanol.

1.5.1.3 Síntesis de *Z*-5-ariliden tioimidazolidine-4-ona **13(a-g)**

Para la síntesis se agregaron los reactivos en el siguiente orden: (1^{ro}) tiohidantoína, (2^{do}) aldehído, (3^{ro}) bicarbonato de sodio saturado. En la Tabla 1.4 se resumen las mejores condiciones de síntesis exploradas para cada molécula de la familia **13(a-g)**.

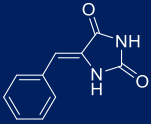
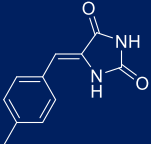
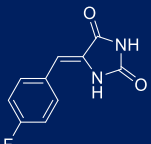
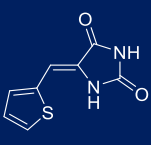
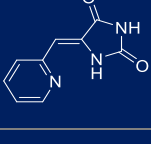
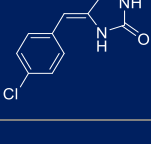
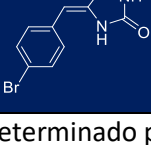
Posteriormente se procedió como en la sección 1.5.1.2 para aislar el producto deseado.

1.5.1.4 Síntesis de *Z*-5-ariliden dihidro imidazotiazolona **14(a-c)**

Para la síntesis se agregaron los reactivos en el siguiente orden: (1^{ro}) tiohidantoína, (2^{do}) aldehído, (3^{ro}) 1,2-dicloroetano, (4^{to}) trietilamina. En la Tabla 1.5 se resumen las mejores condiciones de síntesis exploradas para cada molécula de la familia **14(a-c)**. Los rendimientos se determinaron por HPLC como se indicó en la sección de 1.3 de Resultados y Discusión.

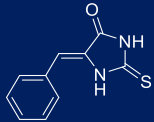
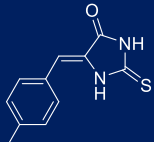
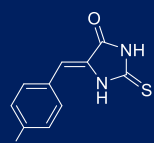

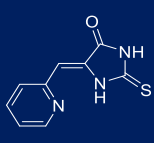
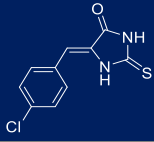
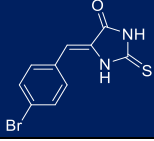
A cada muestra se la extrajo con AcOEt : HCl (0,01 M), recuperando la fase orgánica, la cual se secó con Na₂SO₄ anhidro. Posteriormente se purificaron los productos de reacción con cromatografía en placa preparativa empleando como fase móvil CH₂Cl₂ : AcOEt (80:20), la cual permite diferenciar mejor el compuesto **13** (R_f=0,6) del **14** (R_f=0,3).

Tabla 1.3: Síntesis de Z-5-ariliden tioxoimidazolidine-4-ona **13(a-g)**

Compuesto	Hidantoína 15	Aldehído 19(a-g)	NaHCO ₃ (sat) (mL)	Microondas		Rendimiento (%)
				Temp. (°C)	Tiempo (min)	
12a 	0,203 g (2,03 mmol)	Benzaldehído 19a 0,40 mL (3,9 mmol)	1	150	10	49 *
12b 	0,403 g (4,03 mmol)	4-metil-benzaldehído 19b 0,90 mL (7,6 mmol)	1	140	10	72 **
12c 	0,401 g (4,00 mmol)	4-flúor-benzaldehído 19c 0,90 mL (8,39 mmol)	1	140	30	51 **
12d 	0,403 g (4,03 mmol)	tiofeno-2-carboxaldehído 19d 0,70 mL (7,60 mmol)	1	140	30	71 **
12e 	0,439 g (4,39 mmol)	2-piridin-carboxaldehído 19e 0,80 mL (8,37 mmol)	1	160	10	75 **
12f 	0,845 g (8,45 mmol)	4-cloro-benzaldehído 19f 1,358 g (9,60 mmol)	7,5	140	60	30 ***
12g 	0,839 g (8,39 mmol)	4-bromo-benzaldehído 19g 1,780 g (9,67 mmol)	7,5	140	60	9 ***

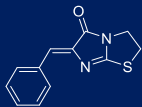
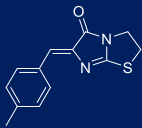

*determinado por UV-Vis; **calculado en forma relativa por CG-EM; ***rendimiento aislado

Tabla 1.4: Síntesis de Z-5-ariliden tioximidazolidine-4-ona **13(a-g)**

Compuesto	Tiohidantoína 15	Aldehído 19(a-g)	NaHCO ₃ (sat) (mL)	Microondas		Rendimiento (%)
				Temp. (°C)	Tiempo (min)	
13a 	0,203 g (1,75 mmol)	Benzaldehído 19a 0,40 mL (3,9 mmol)	1	130	12,5	96 *
13b 	1,600 g (13,8 mmol)	4-metil-benzaldehído 19b 3,40 mL (28,9 mmol)	7,5	140	45	69 ***
13c 	1,457g (12,6 mmol)	4-flúor-benzaldehído 19c 2,70 mL (25,2 mmol)	7,5	140	90	87 ***
13d 	1,601 g (13,8 mmol)	tiofeno-2-carboxaldehído 19d 2,60 mL (26,1 mmol)	7,5	140	90	59 ***
13e 	1,602 g (13,8 mmol)	2-piridin-carboxaldehído 19e 2,70 mL (28,3 mmol)	7,5	140	80	99 ***
13f 	0,929 g (8,01 mmol)	4-cloro-benzaldehído 19f 1,410 g (10,0 mmol)	7,5	140	60	39 ***
13g 	0,920 g (7,93 mmol)	4-bromo-benzaldehído 19g 1,787 g (9,70 mmol)	7,5	140	60	56 ***

*Determinado por UV-Vis; ***rendimiento en masa luego de purificación.

Tabla 1.5: Síntesis de Z-6-ariliden dihidro imidazotiazolona **14(a-c)**

Compuesto	Tiohidantoína	Aldehído	1,2-dicloro- etano	TEA (mL)	Microondas		Rendimiento (%)
					Temp. (°C)	Tiempo (min)	
14a 	0,152 g (1,31 mmol)	Benzaldehído 19a 0,30 mL (2,86 mmol)	0,4 mL (5,08 mmol)	0,5	175	10	98
14b 	0,147 g (1,27 mmol)	4-metil- benzaldehído 19b 0,3 mL (2,60 mmol)	0,4 mL (5,08 mmol)	0,5	175	10	35
14c 	0,147 g (1,27 mmol)	4-flúor- benzaldehído 19c 0,3 mL (2,80 mmol)	0,4 mL (5,08 mmol)	0,5	175	10	17

1.5.1.5 Síntesis de Z-5-benciliden-2-(tioetil)-3,5-dihidro-4H-imidazol-4-ona **22**

Para la síntesis de estos compuestos se incorporaron en el siguiente orden -5-benciliden-2-tioimidazolidin-4-ona **13a** 0,498 g (2,44 mmol), 1-bromoetano 1,0 mL (13,5 mmol) y 7,5 mL de bicarbonato de sodio saturado. La reacción por microondas se realizó alcanzando una temperatura de 85 °C durante 12,5 minutos. Posteriormente al crudo de reacción se lo extrajo con AcOEt : H₂O, recuperando la fase orgánica, y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El rendimiento de la misma fue del 86 %, estimado por CG-EM, detectándose como impureza un 6% del compuesto **21**.

1.5.2 Curvas de calibración de **12a** y **13a**

Las adquisiciones se tomaron en un espectrofotómetro UV-1601 Shimadzu empleando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, disolviendo las muestras en ACN calidad HPLC a las concentraciones indicadas en la Figura 1.20.

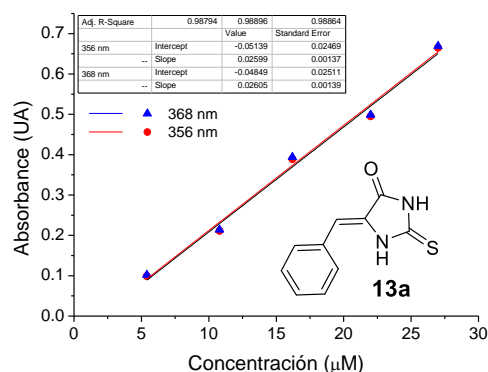
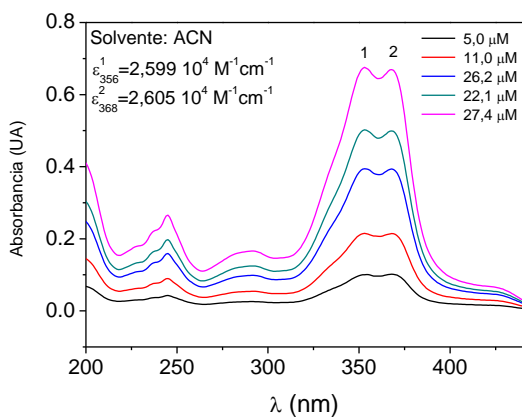
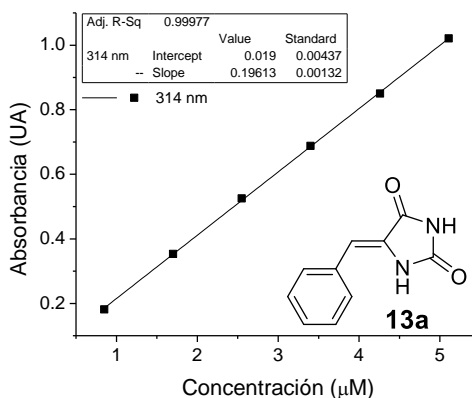
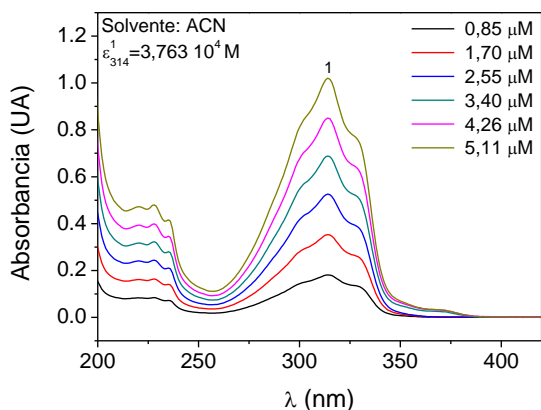


Figura 1.20: espectros UV del compuesto a distintas concentraciones y las curvas de calibración para los compuestos **12a** (superior) y **13a** (inferior)

1.5.3 Curvas de calibración por HPLC para **14(a-c)**

Las determinaciones se realizaron en un equipo de HPLC Waters 1525, con detector de PDA, columna de fase reversa C18 y como fase móvil MeOH : H₂O (85 : 15). Las muestras se prepararon a una concentración de 0,2 mg/mL. La determinación se realizó con un flujo de 0,8 mL/min, y detección 330 nm. Los tiempos de retención fueron: **14a** (5,4 min); **14b** (6,3 min); **14c** (5,1 min).

1.5.4 Cristalografía de Rayos X

Las recrystalizaciones para los derivados **12b**, **13a** y **13c** se realizaron disolviendo las mismas en AcOEt calentando cuidadosamente. Por otro lado, para el compuesto **14a** se empleó una mezcla de AcOEt : CH₂Cl₂, mientras que los compuestos **14b** y **14c** se cristalizaron en CH₂Cl₂. En todos los casos se dejaron evaporar lentamente a temperatura ambiente hasta la formación de los cristales.

Las estructuras cristalográficas fueron obtenidas en el Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Carolina del Sur (Estados Unidos) por Mark Smith. Los datos fueron colectados a 100(2) K, empleando un difractómetro Bruker D8 QUEST equipado con un detector PHOTON-100 CMOS y una fuente microfoco Incoatec (radiación Mo $K\alpha$, $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Los datos crudos del detector fueron reducidos y corregidos por efectos de absorción empleando el Bruker APEX3, SAINT+ y SADABS.^{a,b} Las estructuras fueron resueltas con SHELXT. Se realizaron cálculos de Fourier y refinamiento por cuadrados mínimos de la matriz completa contra F^2 con SHELXL-2018^c empleando OLEX2.^d

^a **APEX3** Version 2018.1-0 and **SAINT+** Version 8.38A. Bruker AXS, Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2016.

^b **SADABS-2016/2**: Krause, L., Herbst-Irmer, R., Sheldrick G.M. and Stalke D. *J. Appl. Cryst.* **2015**, *48*, 3-10.

^c (a) **SHELXT**: Sheldrick, G.M. *Acta Cryst.* **2015**, *A71*, 3-8. (b) **SHELXL**: Sheldrick, G.M. *Acta Cryst.* **2015**, *C71*, 3-8.

^d **OLEX2**: a complete structure solution, refinement and analysis program. Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard J. A. K. and Puschmann, H. *J. Appl. Cryst.* **2009**, *42*, 339-341.

Página en blanco

Capítulo 2

Incorporación del grupo trifluorometilo a 1,3 diaza heterociclos

There is an excitement, adventure and challenge, and there can be great art in organic synthesis. These alone should be enough, and organic chemistry will be sadder when none of its practitioners are responsive to these stimuli.

R. B. Woodward, 1956

Página en blanco

2.1 INTRODUCCIÓN

El flúor es un elemento inusual, ocupa un lugar extremo en la tabla periódica y posee propiedades peculiares que lo diferencian ampliamente de los demás elementos. Como sustituyente es pequeño, de bajo peso molecular y muy electronegativo.^{60,61} En este sentido los enlaces que involucran al átomo de flúor están altamente polarizados y poseen elevadas energías de disociación, por ejemplo, para disociar un enlace C-F es necesario entregar 37 kcal/mol más que para un enlace C-Cl.⁶² La incorporación de flúor a moléculas orgánicas produce modificaciones en la mayoría de sus propiedades fisicoquímicas, como por ejemplo, el pKa, la lipofilidad, como así también cambios estructurales. Cualquiera de estos cambios influye en las propiedades biológicas de los compuestos, pues afecta la estabilidad, solubilidad y permeabilidad en las membranas biológicas, es decir, en su biodisponibilidad.^{60,63} Por estas características y su potencial intrínseco, es que alrededor del 30-40 % de los agroquímicos y el 20 % de los fármacos en el mercado contienen flúor.⁶¹

No obstante, entre las décadas de 1940 y 1950 la idea de introducir átomos de flúor en productos naturales y generar un beneficio en sus propiedades biológicas era prácticamente inconcebible.⁶⁴ De hecho, el primer compuesto fluorado aislado naturalmente, el monofluoroacetato de sodio, demostró ser extremadamente tóxico.⁶⁵ No fue hasta 1953 cuando Josef Fried y Emily Sabo notaron bioactividad de una fludrocortisona **24** (Figura 2.1), la cual se convirtió en el primer producto farmacéutico fluorado.⁶⁶

Es apreciable cómo al incorporar átomos de flúor o grupos fluorados en el diseño de nuevos fármacos, se mejora la actividad de los mismos. Por ejemplo, en la formulación de Sitagliptina **27**, un inhibidor enzimático utilizado para el tratamiento de la diabetes Tipo II, se observó que al adicionar átomos de flúor aumentaba su actividad como inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DDP-IV). En el Esquema 2.1 se puede apreciar que partiendo del precursor **25** la actividad mejora doscientas veces al incorporar tres átomos de flúor en distintas posiciones del anillo aromático (**26**), y a su vez la actividad mejora tres veces al fusionar el anillo de piperazina con un 1,2,4-triazol de cinco miembros que incorpora el grupo trifluorometilo (**27**).⁶⁷

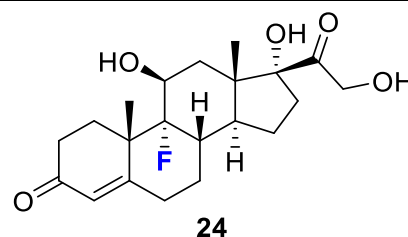
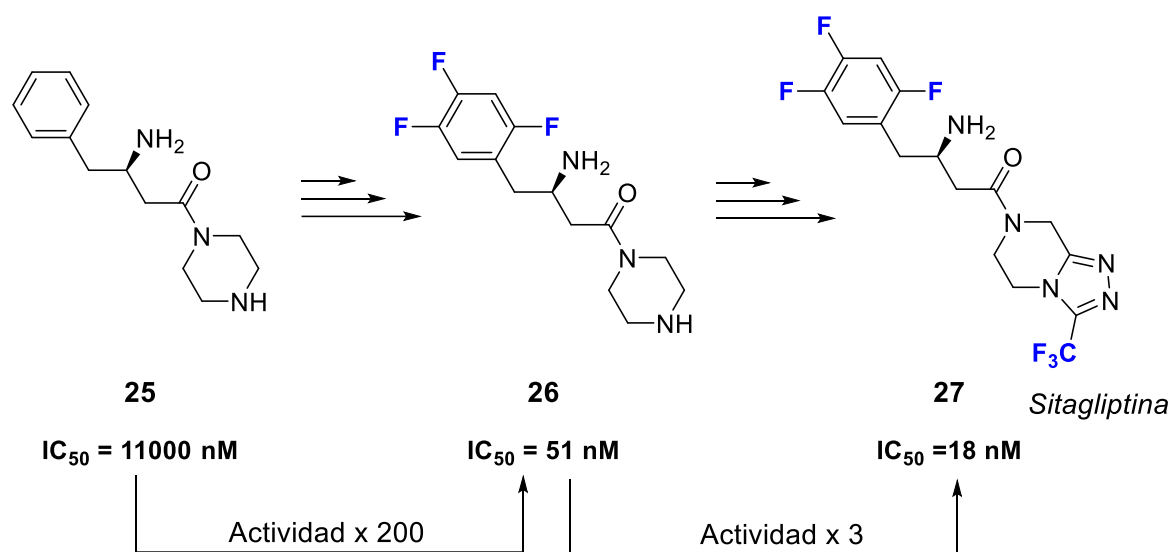


Figura 2.1: estructura de la fludrocortisona



Esquema 2.1: incorporación de grupos fluorados en la formulación de Sitagliptina

Muy pocos compuestos organofluorados existen en la naturaleza, por lo que, sumado al amplio espectro de aplicaciones de éstos, existe un gran estímulo al desarrollo de nuevas metodologías sintéticas que permitan generar fácilmente este tipo de compuestos. Sin embargo, incorporar grupos fluorados fácil y selectivamente, representa un gran desafío sintético.^{60,61}

Los grupos fluorados comúnmente introducidos en moléculas orgánicas son la unidad gem-difluor (CF_2 -, que se considera una sustitución isóstera e isopolar del oxígeno), y los sistemas portadores de sustituyentes trifluorometilo (CF_3 -, CF_3CF_2 -, $CF_3C(O)$ -, etc).⁶⁸⁻⁷¹ Por su parte, existen principalmente dos metodologías para la obtención de moléculas orgánicas fluoradas o perfluoradas: una consiste en la incorporación de un grupo fluorado apropiadamente en algún paso de síntesis, mientras que en la otra se comienza con un *building-block* fluorado y subsiguen otras reacciones.⁶¹

Actualmente existen diversos *building-block* que permiten la incorporación de grupos fluorados; en la Figura 2.2 se ilustran algunos reactivos empleados para la incorporación del grupo trifluorometilo. El reactivo de Rupper-Prakash **28** así como la trifluoroacetamida **29** son empleados en la trifluorometilación de aldehídos y cetonas.^{72,73} Por otro lado, una de las reacciones típicas para la incorporación del grupo trifluorometilo es la trifluoroacetilación con anhídrido trifluoro acético (ATFA) **30**, el cual permite realizar reacciones de sustitución electrofílica e introducir un grupo $C(O)CF_3$.⁷⁴ Asimismo, el anhídrido **30** se puede emplear para la producción del trifluoro acetil vinil éter (TFAVE) **31**, el cual ha sido empleado en cicloadiciones, para la incorporación de un grupo trifluoro

metilo,⁷⁵ o bien en reacciones sobre el grupo vinilo, para la generación de compuestos trifluorometil acetil sustituidos.⁷⁶

En el diseño de nuevas estructuras orgánicas se han publicado diversos logros sintéticos a partir de TFAVE **31**. En el Esquema 2.2 se ilustran dos rutas sintéticas las cuales emplean el TFAVE **31** para la incorporación del grupo trifluorometilo a moléculas orgánicas. Por un lado, por la ruta **A** del Esquema 2.2 se obtienen trifluorometil acetil pirroles **32**,⁷⁶ mientras que por la ruta **B** del mismo se sintetizó un compuesto cíclico fusionado bis-trifluorometilado **33**.⁷⁷ De este modo, se puede apreciar la versatilidad del TFAVE **31** en la síntesis de nuevos compuestos fluorados.

En nuestro grupo de investigación se cuenta con una vasta experiencia en la síntesis de nuevos compuestos heterocíclicos trifluorometilados, algunos de ellos se indican en la Figura 2.3. En particular, se ha explorado la incorporación del grupo CF₃ en derivados de tiofenos y pirroles; además del estudio de reactividad térmica y fotoquímica de derivados bioactivos de dihidropiridinas.^{69,70,79-81}

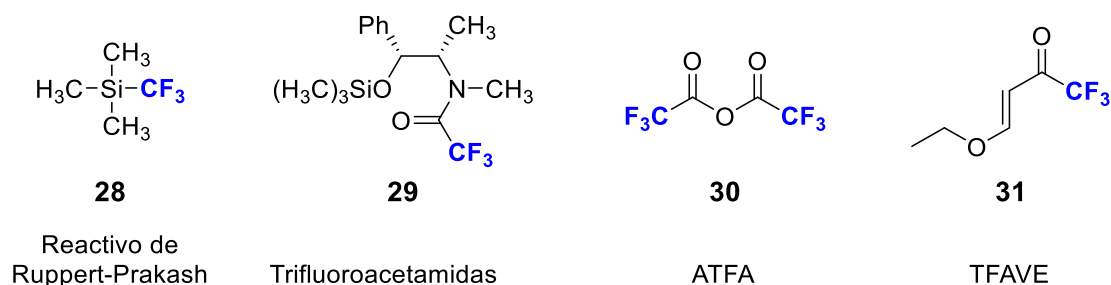
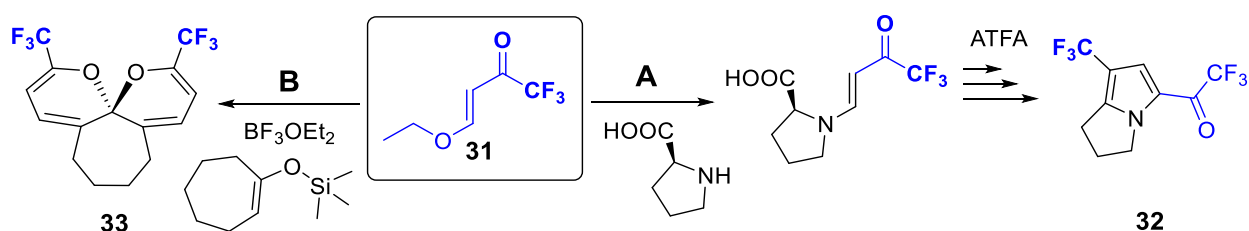


Figura 2.2: reactivos empleados para la incorporación del grupo trifluorometilo.



Esquema 2.2: ejemplos de síntesis con TFAVE **31** en la obtención de pirroles **32** y ciclos fusionados **33**

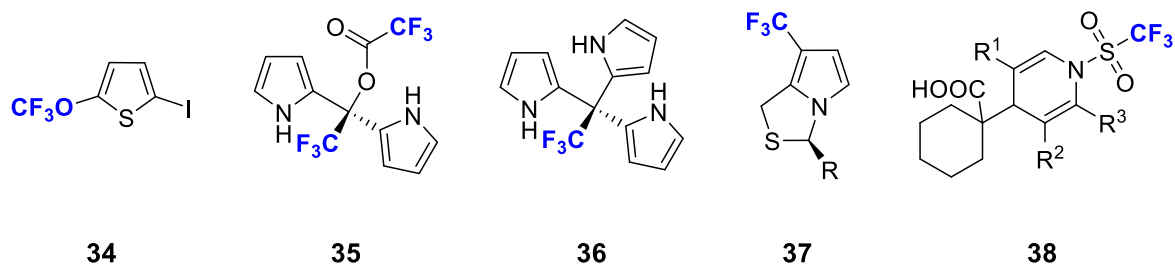


Figura 2.3: compuestos trifluorometilados sintetizados (**34-36**) y caracterizados (**37-38**) previamente en el grupo de investigación

Por lo mencionado anteriormente, en este capítulo se describen los resultados obtenidos en las reacciones de modificación de heterociclos, con la perspectiva de obtener nuevos derivados que incorporen el grupo trifluorometilo empleando exclusivamente como *building-block* fluorado, el TFAVE 31.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

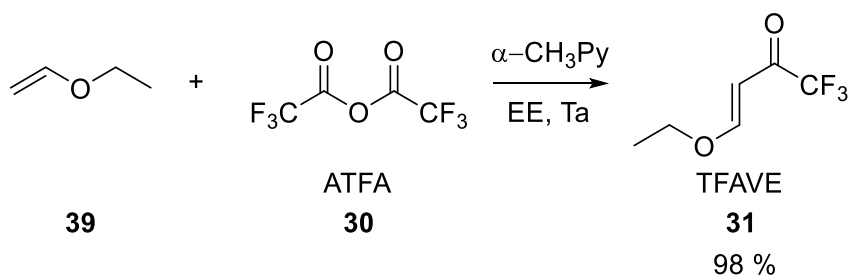
- i) Generar nuevos derivados trifluorometilados de los núcleos descritos en el Capítulo 1, empleando como *building-block* fluorado el trifluoro acetyl vinyl éter.
- ii) Caracterizar los compuestos sintetizados como así también comprender sus mecanismos de reacción y reactividad.

Página en blanco

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Síntesis del *building-block* trifluoro acetil vinil éter

Para la incorporación del grupo trifluorometilo se empleó como *building-block* el trifluoro acetil vinil éter (TFAVE) **31**. Esta molécula presenta una elevada reactividad debido a su versátil funcionalización. La síntesis de **31** se llevó a cabo en el laboratorio modificando levemente la metodología ya publicada por Hojo *et al.*⁸¹ Para esto se realiza una reacción de sustitución electrofílica a partir de etil vinil éter **39** y anhídrido trifluoro acético (ATFA) **30**, como se indica en el Esquema 2.3. El producto final es de isomería *trans* y se obtiene con elevados rendimientos (98 %).

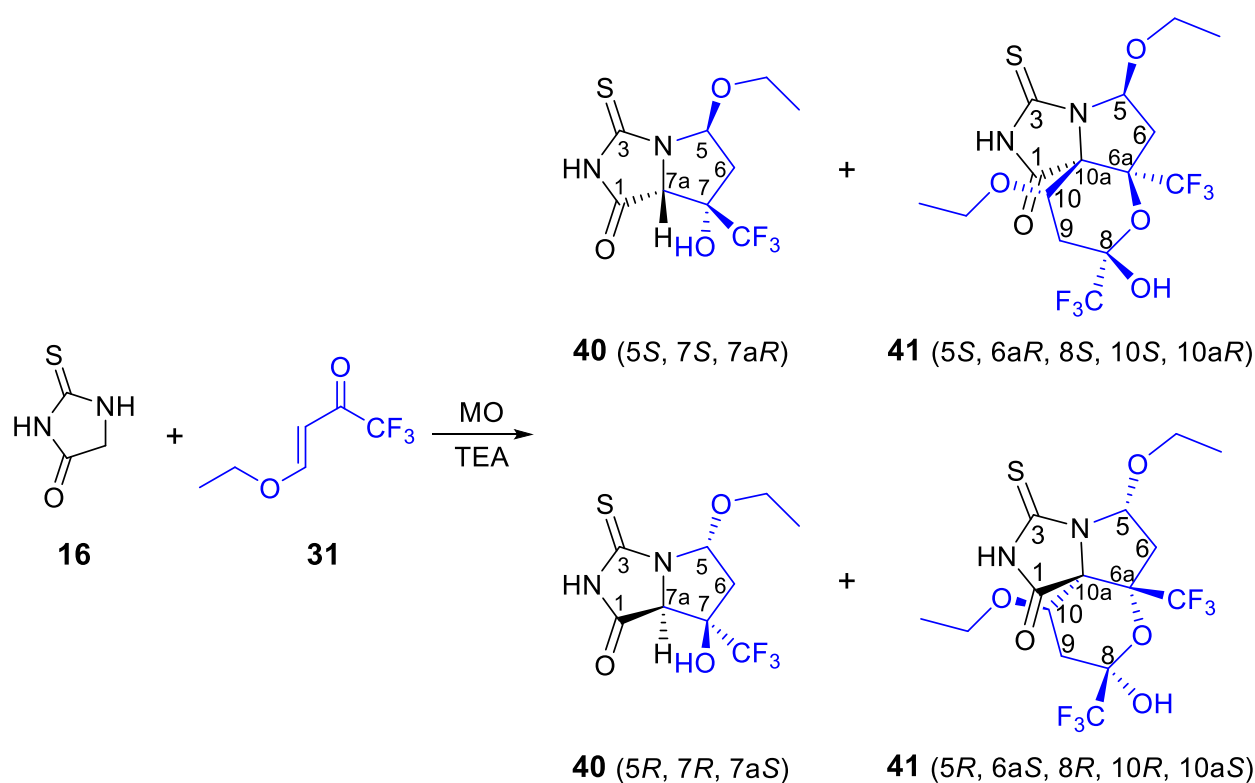


Esquema 2.3: reacción de síntesis de trifluoro acetil vinil eter

2.3.2 Trifluorometilación de 2-tiohidantoína

En una segunda etapa, el TFAVE **31** sintetizado se emplea como reactivo para la incorporación del grupo trifluoro metilo a 2-tiohidantoína **16**. Todas las reacciones de síntesis se realizan mediante MAOS (*Microwave Assisted Organic Synthesis*), debido a las ventajas ya mencionadas en el Capítulo 1.

Para estas reacciones no se utilizó solvente, sólo una pequeña cantidad de trietilamina (TEA) que actúa como base y medio de reacción. Es importante destacar que el empleo de TEA es sustancial, ya que en caso contrario no se forman productos. Concluida la reacción de síntesis, se aislaron dos productos mayoritarios con sus respectivos enantiómeros, una pirrolidina bicíclica identificada como pirrolo[1,2-c]imidazol-1-ona **40** y un compuesto tricíclico identificado como pirano[3',2':2,3]-pirrolo[1,2-c]imidazol-1-ona **41**, Esquema 2.4.



Esquema 2.4: productos de la trifluorometilación de 2-tiohidantoína

La reacción del Esquema 2.4 no puede ser monitoreada por CG-EM debido a que los productos se descomponen a las elevadas temperaturas del inyector. Por este motivo, fue necesario ajustar las mejores condiciones para seguir la formación de productos por HPLC. De este modo, para la cuantificación y monitoreo de la reacción de síntesis, a partir de los productos puros se construyeron dos curvas de calibración, las cuales se ilustran en la Figura 2.4.

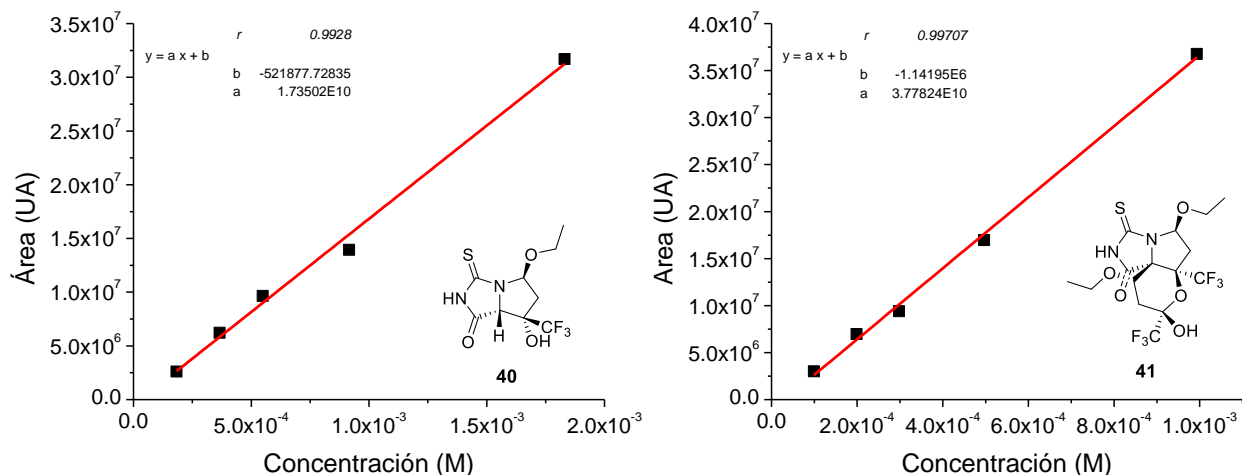


Figura 2.4: curvas de calibración de **40** (izquierda) y **41** (derecha)

Tabla 2.1. rendimientos para los productos **40** y **41**

Relación estequiométrica	Rendimiento (%)	
	40	41
16:31		
1:0,5	29	2
1:1,1	48	7
1:2,0	52	14
1:4,0	41	7

En un primer intento de mejorar las condiciones de síntesis para aumentar el rendimiento de reacción, se modificaron las relaciones estequiométricas de los reactivos 2-tiohidantoína **16** y TFAVE **31**, como se indica en la Tabla 2.1. Estas reacciones se llevaron a cabo por irradiación con microondas manteniendo la temperatura a 80 °C durante 15 minutos.

Sin embargo, contrariamente a lo esperado, los rendimientos disminuyen con un gran exceso de TFAVE **31**, obteniéndose como máximo un 52 % para el compuesto bicíclico en la relación de 2-tiohidantoína **16** : TFAVE **31** de 1:2,0. Esto se atribuye a que el reactivo fluorado **31** es susceptible a hidrólisis y polimerización,^{75,82} procesos que se ven incrementados al aumentar su concentración. De esta serie de experimentos, se concluye que los mejores resultados se obtienen cuando la reacción se lleva a cabo con una relación molar de los reactivos de 1:2,0, pues en las otras relaciones estequiométricas ensayadas los rendimientos fueron menores.

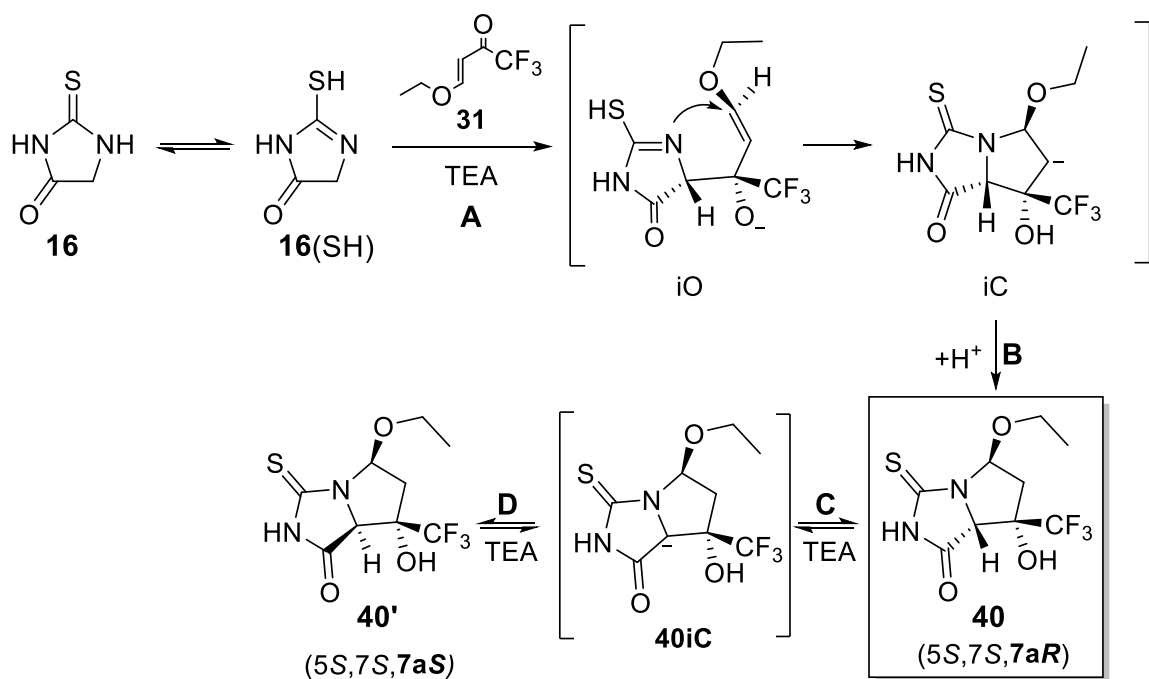
A partir de los resultados anteriores se intentó dirigir la reacción a una mayor selectividad hacia la formación discriminada del biciclo **40** y el triciclo **41**. Para ello, se realizaron una serie de experimentos explorando diferentes temperaturas y tiempos de reacción, conservando la relación estequiométrica de los reactivos en 1:2,0. Los resultados se indican en la Tabla 2.2, y de los mismos

Tabla 2.2: rendimientos de **40** y **41** bajo diferentes condiciones de síntesis

Condiciones de MAOS		Rendimientos (%)	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	40	41
80	15	52	14
	20	68	19
	25	34	14
90	15	56	41
	20	30	16
	25	44	19
100	15	43	21
	20	41	22
	25	49	18

se puede observar que, si bien no hay una tendencia definida, la mejor condición de síntesis para **40** es de 80 °C y 20 minutos, llegando a un rendimiento del 68%, A tiempos y temperaturas mayores, sólo se observa un decrecimiento de los rendimientos, probablemente debido a reacciones competitivas de polimerización del TFAVE **31** que van en detrimento de los productos deseados. Además, se determinó que un aumento de la temperatura y un tiempo de reacción igual a 15 minutos produce un incremento en el rendimiento de **41**, siendo del 41 % a 90 °C.

Debido a las complejas estructuras, posibilidad de isomería y numerosos centros quirales de **40** y **41**, resulta interesante poder comprender los mecanismos de reacción para la formación de ambos compuestos. Para la formación del biciclo **40** se propone el mecanismo de reacción del Esquema 2.5, el cual resulta sencillo y se fundamenta en la reactividad del heterociclo. Anteriormente se ha demostrado que la 2-tiohidantoína forma un carbanión en presencia de TEA; y es éste quien comienza la reacción atacando nucleofílicamente al carbonilo del TFAVE **31**, (paso **A**, Esquema 2.5). Seguidamente, el par no enlazante del nitrógeno (iO) reacciona con el grupo vinilo intramolecularmente para dar origen al anillo fusionado de cinco miembros (iC). Esta propuesta resulta muy adecuada ya que el nucleófilo más fuerte ataca al electrófilo más fuerte, y en el mismo sentido, el nucleófilo más débil reacciona con el electrófilo más débil para dar lugar al producto final **40** (paso **B**, Esquema 2.5).



Esquema 2.5: mecanismo de formación propuesto para el biciclo **40**

Cabe destacar que el hidrógeno cabeza de puente del compuesto **40** (5*S*, 7*S*, 7*aR*) se puede intercambiar generando así un diastereómero **40'** (5*S*, 7*S*, 7*aS*), como se indica en los pasos **C** y **D** del Esquema 2.5. Este diastereómero, como cualquier otro posee propiedades fisicoquímicas distintas y se puede detectar por RMN-¹H y su proporción es de sólo un 2 %, Figura 2.5.

La formación del intermediario propuesto **40iC** no pareciera estar favorecida ya que corresponde a un anión terciario, pero cabe destacar que el mismo se puede estabilizar por conjugación con el carbonilo adyacente y, además posee un grupo trifluorometilo, tomador de densidad electrónica, próximo al mismo.

En este sentido, en el grupo de investigación se realizaron cálculos teóricos para corroborar los valores de las poblaciones obtenidas experimentalmente para ambos diastereómeros en TEA (medio de reacción) y en acetona (solvente empleado para las adquisiciones por RMN). De este modo, se calculó la función de partición canónica de cada estructura, considerando las contribuciones de energía traslacional, rotacional, electrónica y vibracional (Ecuación 2.1); asimismo se calculó la energía interna de cada estructura (ΔU) estableciendo como referencia ($\Delta U=0$) la del diastereómero más favorable energéticamente, es decir, **40** (5*S*, 7*S*, 7*aR*). Posteriormente, mediante la Ecuación 2.2 se

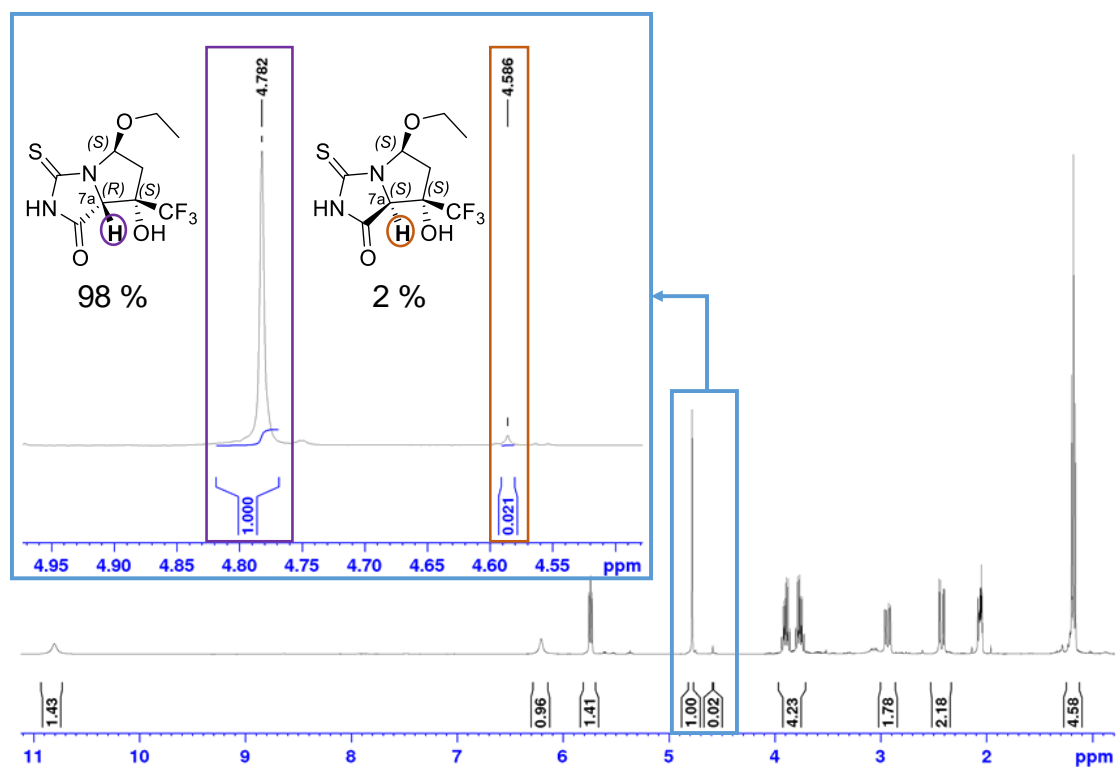


Figura 2.5: espectro de RMN-¹H en acetona-*d*₆ del compuesto **40**, en el mismo se amplía la señal del H^{7a}

estimó el cociente de las poblaciones entre ambas estructuras, pudiendo así obtener las proporciones relativas indicadas en la Tabla 2.3. Como se puede apreciar, la población de **40** (5*S*, 7*S*, 7*aR*) es predominante respecto al diastereómero **40'** (5*S*, 7*S*, 7*aS*), y esta tendencia se correlaciona con lo observado por RMN-¹H.

$$Q_C = Q_{\text{traslacional}} + Q_{\text{rotacional}} + Q_{\text{electrónica}} + Q_{\text{vibracional}} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

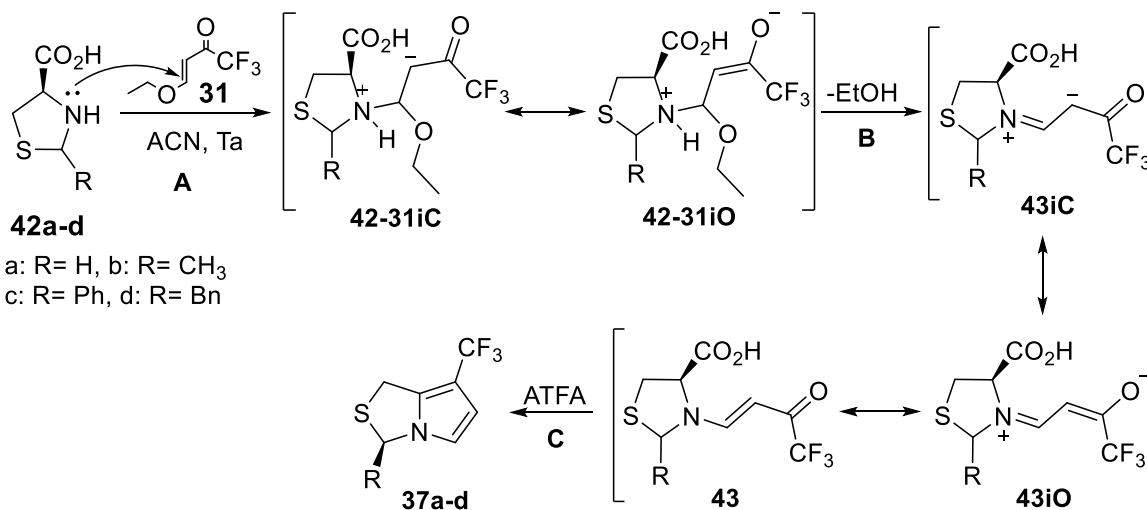
$$\frac{N_{C1}}{N_{C2}} = \frac{Q_{C2}}{Q_{C1}} e\left(\frac{-\Delta U^2-1}{RT}\right) \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Tabla 2.3: resultados teóricos de las poblaciones relativas entre los diastereómeros **40** y **40'**

	TEA		Acetona- <i>d</i> ₆	
	40' (5 <i>S</i> , 7 <i>S</i> , 7 <i>aS</i>)	40 (5 <i>S</i> , 7 <i>S</i> , 7 <i>aR</i>)	40' (5 <i>S</i> , 7 <i>S</i> , 7 <i>aS</i>)	40 (5 <i>S</i> , 7 <i>S</i> , 7 <i>aR</i>)
ΔU (kJ/mol) *	11,97	0	11,53	0
Población relativa (%)	99,999	0,001	0,0017	99,9993

*Gaussian 09 B3LYP 6-311G(d,p)

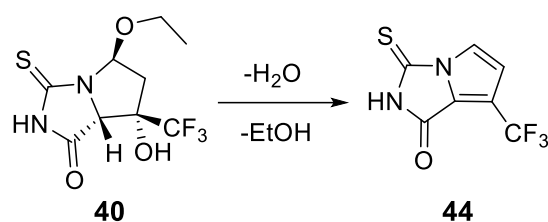
Por otra parte, al analizar los mecanismos de formación de otros 1,3-heterociclos con TFAVE **31**, resulta interesante remarcar que, por lo general, se observa una pérdida de etanol posterior a la incorporación de este *building-block* fluorado.^{78,79} Por ejemplo, en el Esquema 2.6 se resume el mecanismo de reacción de la síntesis de trifluorometil-1*H*,3*H*-pirrol[1,2-*c*]tiazoles **37(a-d)**, en donde luego de la reacción del TFAVE **31** con tiazolidina **42** (paso **A**) se genera un intermediario inestable **42-31i**, el cual rápidamente pierde etanol generando un sistema con mayor conjugación **43** (paso **B**).



Esquema 2.6: mecanismo de formación de trifluorometil pirrol tiazoles **37(a-d)**, remarcando la pérdida de etanol en el paso **B**.

Por el contrario, en la síntesis de **40** esto no ocurre, ya que como se planteó en el mecanismo del Esquema 2.5, la reacción da inicio luego de generar el carbanión que ataca nucleofílicamente al carbonilo del TFAVE **31**, y no al grupo vinilo como ocurre en la reacción del Esquema 2.6, pues en este último caso el ataque está dado por el par no enlazante del nitrógeno del heterociclo, el cual es menos nucleofílico que un carbanión.

Por otro lado, luego de varios pasos de purificación se identificó y aisló un tercer compuesto, cuya estructura se corresponde a la deshidratación y pérdida de etanol de **40**, generando así un compuesto aromático **44**, indicado en el Esquema 2.7.



Esquema 2.7: deshidratación y eliminación de etanol de **40** para generar el nuevo compuesto **44**

A fin de corroborar que la formación del compuesto **44** provenga efectivamente del biciclo **40** se realizaron reacciones de pirólisis estática, con el objetivo de forzar la deshidratación y eliminación de etanol de **40**. Estas reacciones se llevaron a cabo a dos

temperaturas con **40** previamente purificado. Posteriormente se analizaron los crudos de reacción por RMN-¹⁹F, ya que **44** presenta una señal característica a (-58,8 ppm) en acetona-*d*₆. En la Figura 2.6 se ilustran los espectros de RMN-¹⁹F adquiridos luego de la pirólisis a 200 °C y 300 °C, y de los mismos se puede apreciar que al aumentar la temperatura aumenta la intensidad de la señal del compuesto aromático **44**. Sin embargo, la reacción de pirólisis no es selectiva y genera otros compuestos fluorados como se aprecia en los espectros de la Figura 2.6. De este modo, se concluye que el compuesto **44** es un subproducto de síntesis, y que proviene de la deshidratación y eliminación de etanol desde el biciclo **40**. Por otro lado, es importante destacar que el mismo se obtiene en el crudo de reacción en muy bajas proporciones y sólo se ha logrado aislar luego de purificar grandes cantidades.

Debido a la estructura de los productos de síntesis del Esquema 2.4, el compuesto triciclíco **41** no podría formarse a partir de una adición secuencial de una segunda molécula de TFAVE **31** al biciclo **40**; por lo tanto, puede que exista la posibilidad de que un dímero del TFAVE **31** se incorpore al

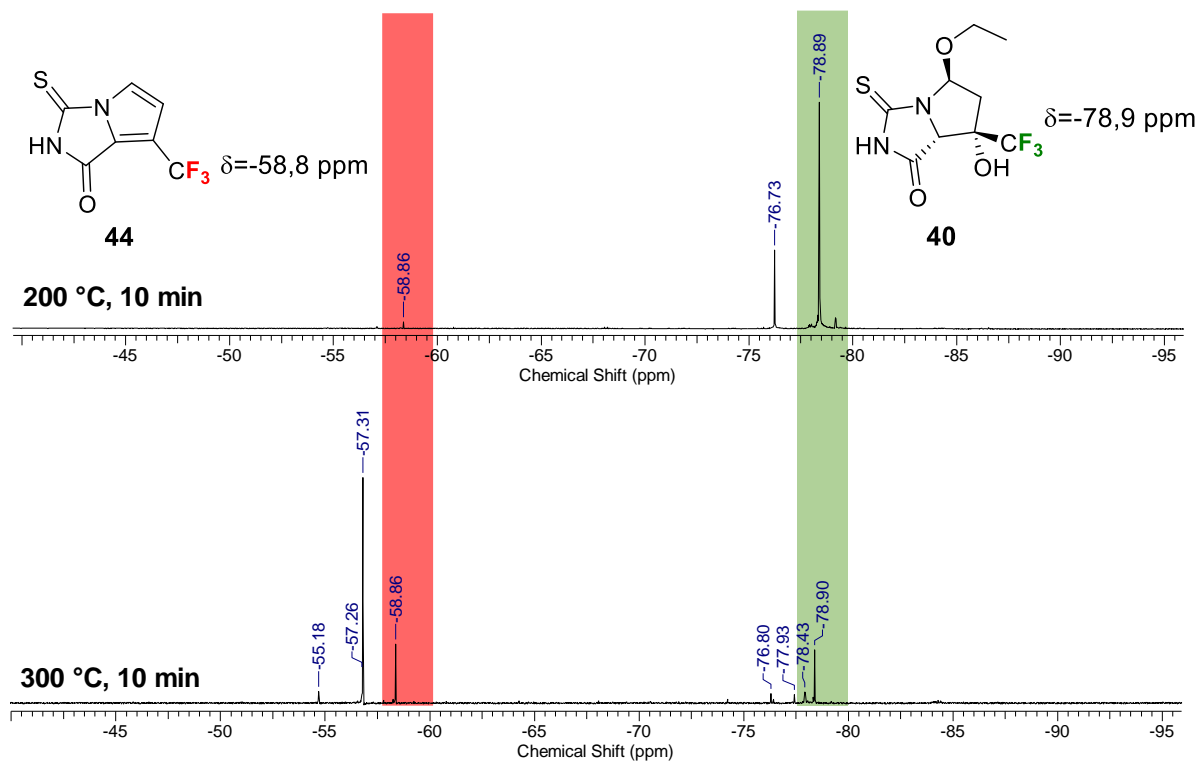
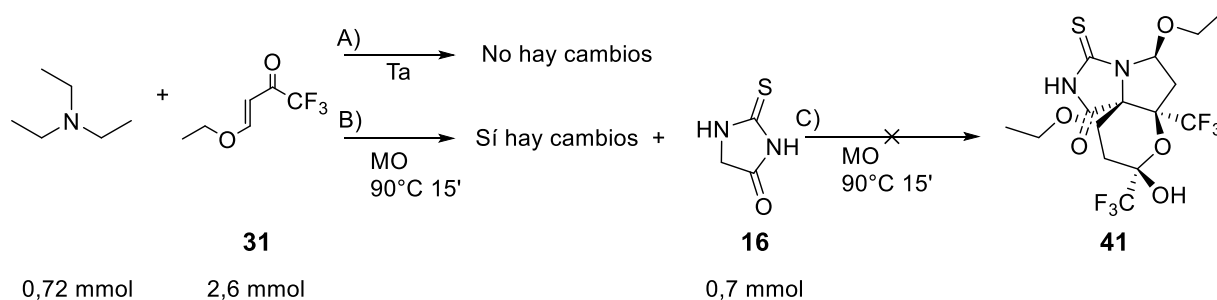


Figura 2.6: espectros RMN- ^{19}F de pirolizado de **40** a 200 °C (superior) y a 300 °C (inferior)

sustrato **16** generando de manera directa el triciclo **41**. Con el objetivo de profundizar el estudio del mecanismo de reacción, se realizó un experimento en el cual se intentó aislar algún intermediario que al reaccionar sea capaz de llevar a cabo esta última reacción. En este sentido, se realizaron diferentes ensayos que se resumen en el Esquema 2.8, y cuyos crudos de reacción se analizaron por RMN- ^1H y ^{-19}F . Dicho estudio permitió observar que por el camino **A**, en donde la mezcla de TEA y TFAVE **31** no es irradiada en el MO, no hay cambios significativos en el crudo de reacción; contrario a lo esperado no se generó un intermediario aislable proveniente del TFAVE **31**. Mientras que el camino **B** demostró que al irradiar con MO (90 °C, 15 minutos) y luego de dejar que la mezcla alcance temperatura ambiente, las señales de RMN correspondientes a TFAVE **31** desaparecieron, pudiéndose



Esquema 2.8: reacciones llevadas a cabo para el estudio mecanístico de la formación de **41**

identificar otras nuevas. Posteriormente, a esta mezcla que sí reaccionó (camino **B**, Esquema 2.8) se le incorporó la 2-tiohidantoína **16**, y se irradió con MO nuevamente, a 90 °C durante 15 minutos (camino **C**, Esquema 2.8). Sin embargo, luego de enfriar y analizar el crudo de reacción, no se detectó la formación de ninguno de los productos de síntesis **40** y **41**.

A partir de los resultados de RMN-¹H del crudo de reacción (camino **B**, Esquema 2.8), se pudieron identificar fragmentos de un intermediario conformado por dos moléculas de TFAVE **31** y una de TEA. Estos fragmentos se explicitan en la Figura 2.7 junto al espectro de RMN-¹H, donde también se indica la estructura propuesta de un intermediario zwitteriónico **45** que podría reaccionar directamente con 2-tiohidantoína **16** para generar **41**. Cabe destacar que no fue posible aislar a dicho intermediario, pero de la reacción **B** del Esquema 2.8, se pudieron identificar mediante RMN-¹H señales simples provenientes de los fragmentos de este intermediario, que rápidamente se descompone, entre otras sustancias, en trifluorometil vinil cetona. De esta última molécula, por RMN-¹⁹F se logró identificar la señal a -75,71 ppm, característica del grupo CF₃ de este compuesto.

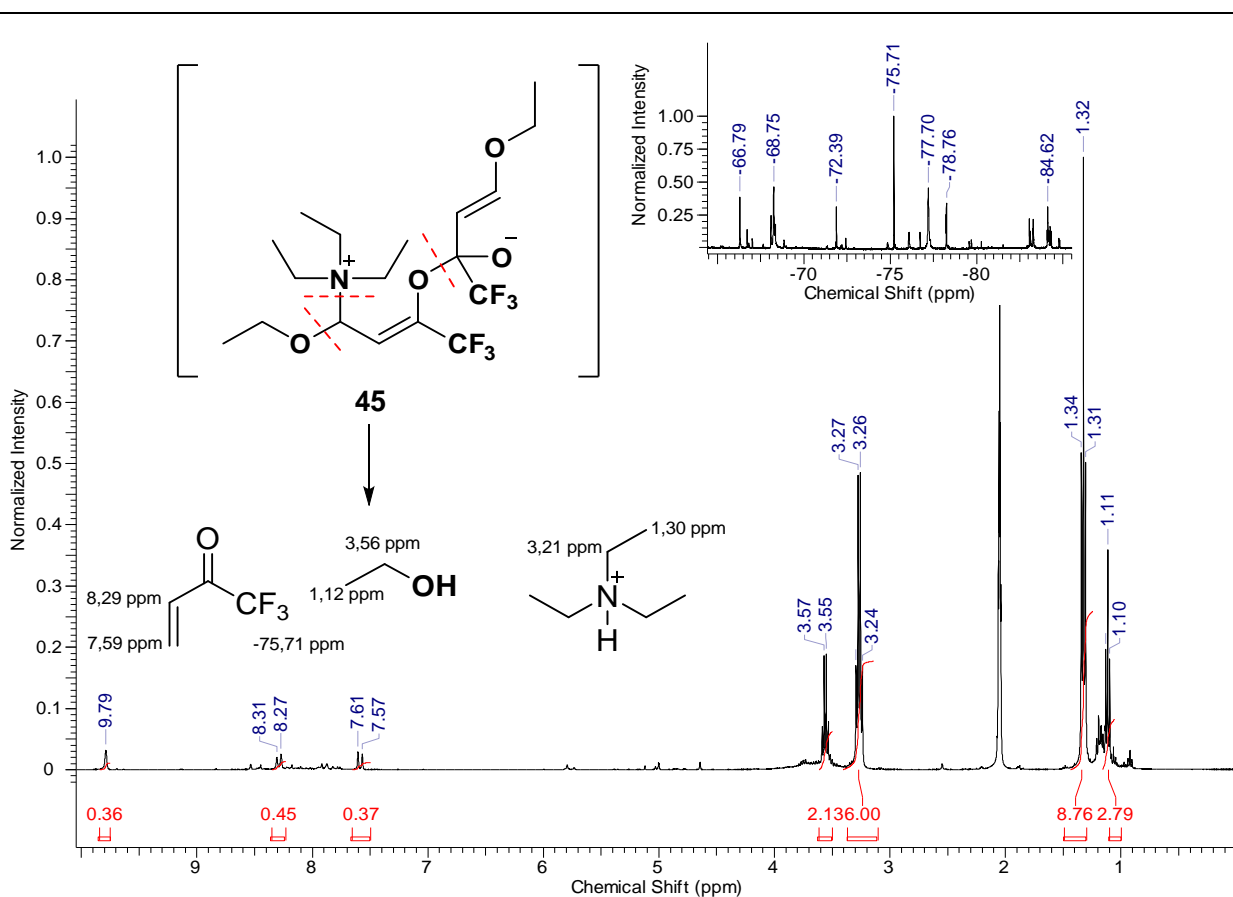
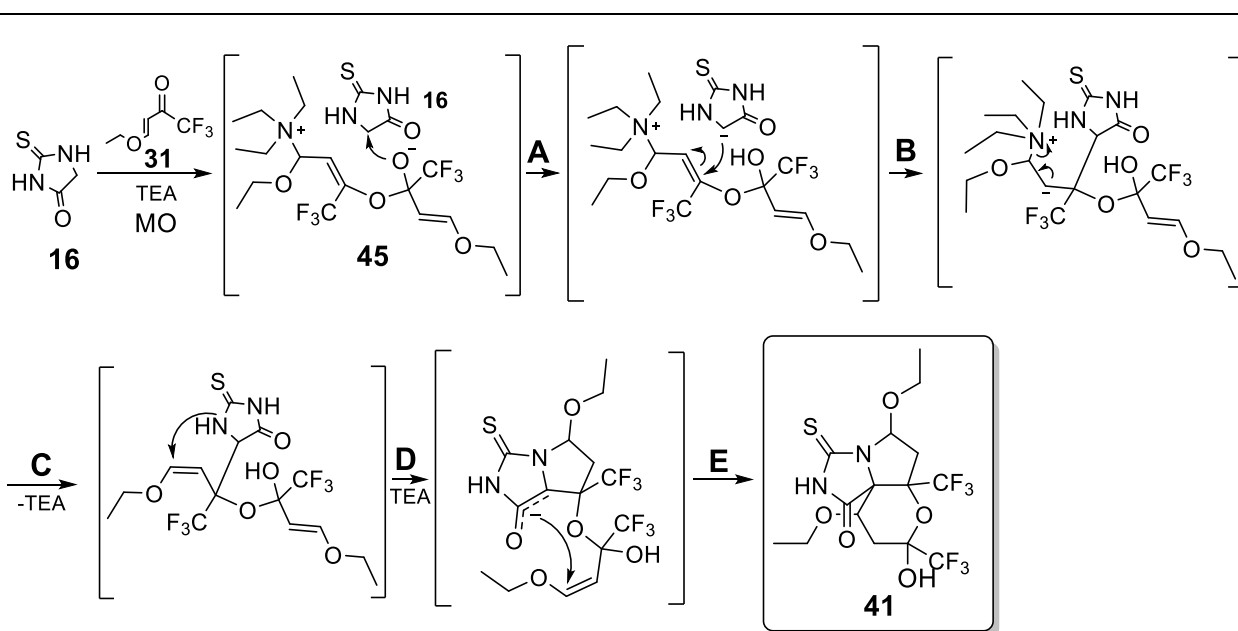


Figura 2.7: RMN-¹H y -¹⁹F en acetona-*d*₆ de la reacción entre TFAVE y TEA (camino **B**, Esquema 2.9), indicando los fragmentos del intermediario zwitteriónico propuesto **45**.

Estos hallazgos indicarían que la vía independiente en la formación de **41** indudablemente involucra un intermediario dimérico de TFAVE **31** altamente reactivo, el cual se genera *in situ*, y reacciona rápida y directamente con 2-tiohidantoína **16** para formar **41**; pero al realizar la síntesis en dos pasos el mismo se descompone en otra sustancia.

En este sentido, se propone un mecanismo para la formación de **41** en presencia de TEA (Esquema 2.9), en el que el intermediario **45** forma una sal con la 2-tiohidantoína **16** (paso A), formando un carbanión altamente nucleofílico, que ataca al grupo vinilo más electrofílico, generando un enlace covalente (paso B,) y la subsecuente pérdida de la molécula de TEA (paso C). Posteriormente, el par de electrones no enlazantes del nitrógeno del heterociclo reacciona intramolecularmente con el grupo vinilo generando el biciclo (paso D). Seguidamente, el carbanión generado ataca rápidamente al grupo vinilo de la cadena lateral para formar el intricado triciclo de **41** (paso E).



Esquema 2.9: mecanismo propuesto para la formación de **41**, involucrando el intermediario **45**.

Por otra parte, es importante destacar que, como se puede apreciar de los esquemas anteriores, las estructuras de los compuestos **40** y **41** son muy complejas debido a la gran cantidad de centros quirales e isómeros que podrían presentar; por lo que para la elucidación estructural fue necesario combinar diferentes técnicas espectroscópicas, principalmente RMN en 1D (^1H , ^{13}C , ^{19}F) y 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY). A partir de los espectros obtenidos por acoplamiento en el espacio

fue posible determinar la configuración estereoquímica de casi todos los carbonos. Dichos acoplamientos se representan en la Figura 2.8 para el biciclo **40**.

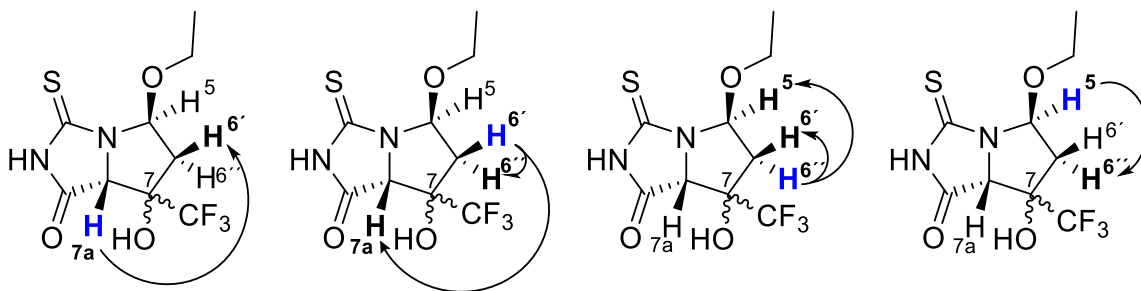


Figura 2.8: acoplamientos en el espacio para **40**

Desafortunadamente, la configuración estereoquímica del C7 no pudo ser determinada por técnicas de RMN, por lo que luego de varios intentos de recristalización se logró no sólo cristalizar el compuesto **40**, sino que también se obtuvieron cristales del compuesto **41**. De este modo, se pudo determinar la estructura por difracción de rayos X de monocristal para ambos compuestos, permitiendo confirmar inequívocamente la estructura de los productos de síntesis, Figura 2.9.

Como se puede apreciar en las estructuras de de la Figura 2.9, el C-7 de **40** posee una configuración diferente al C-6a de **41**, por lo que no resulta posible que este último se genere de manera secuencial por la adición de una segunda molécula de TFVE **31**. En efecto, se realizó una reacción de síntesis a partir de **40** cuidadosamente purificado, incorporando, y se obtuvo un 9 % de un compuesto del mismo tiempo de retención por HPLC que **41**, pero no se pudo purificar para su identificación y caracterización. Es posible que dicho compuesto sea otro isómero estructural a **41**, con una estereoquímica diferente.

Es importante remarcar que a partir de los datos polarimétricos se determinó que **40** y **41** son mezclas racémicas ($\alpha_D^{25} = 0$, en ACN). De hecho, a partir de los resultados cristalográficos de ambos compuestos se vislumbró que en cada celda unidad se encuentran los dos enantiómeros, conformando lo que se conoce como **racemato verdadero** (Figura 2.9). Asimismo, debido a que de cada uno de los compuestos sintetizados tiene solamente un diastereómero de los ocho posibles para **40** y de los treinta y dos posibles para **41**, se puede afirmar que la reacción es altamente regioespecífica.

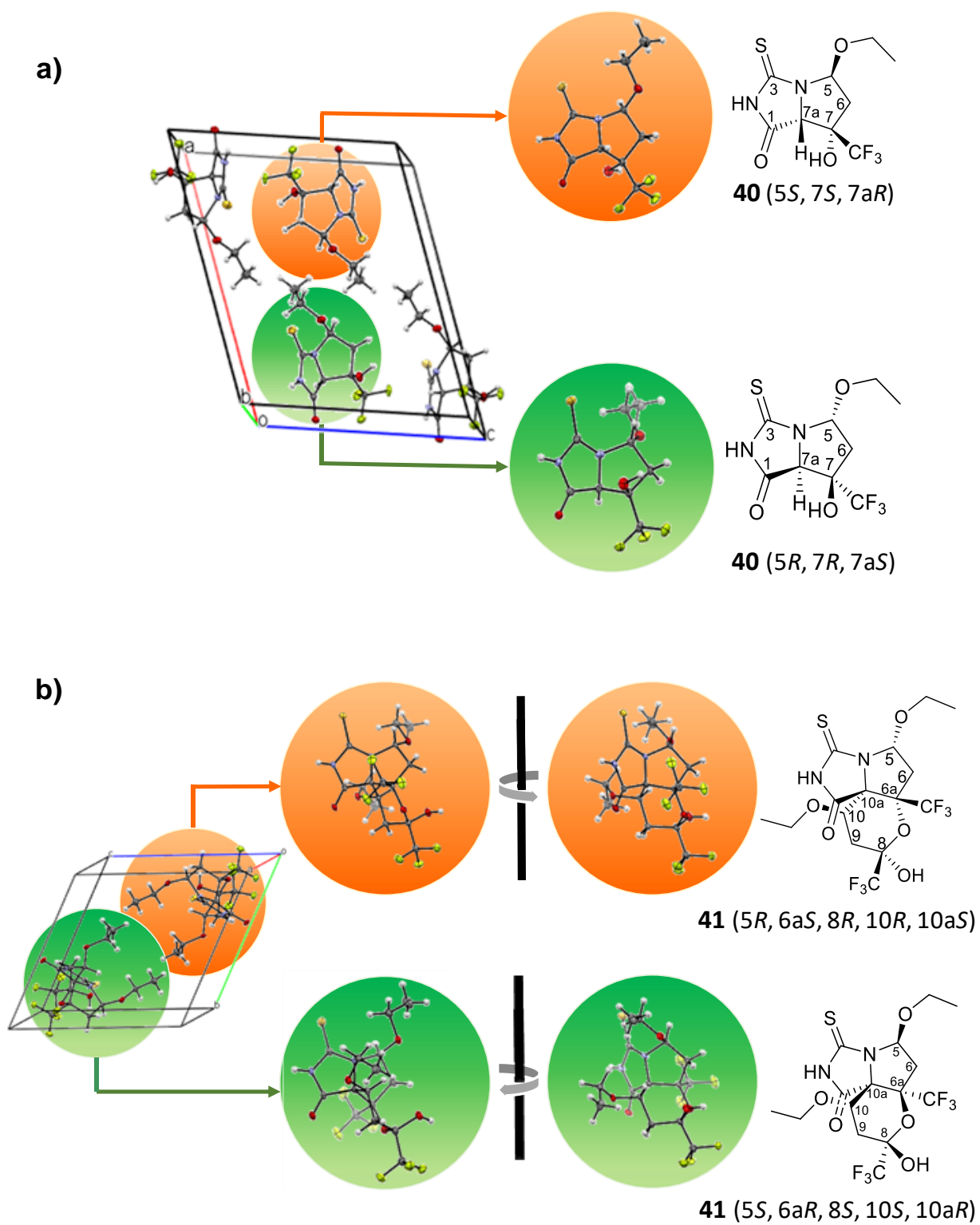
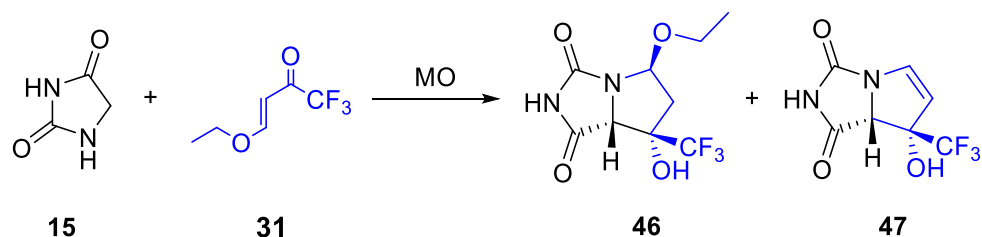


Figura 2.9: celda unidad de (a) **40** y (b) **41**, ampliando la estructura ORTEP de los enantiómeros presentes en cada celda unidad.

2.3.3 Trifluorometilación de hidantoína

Como en la sección anterior, se realizaron distintas síntesis con el objetivo de incorporar el grupo trifluorometilo al heterociclo de hidantoína. A partir del análisis por CG-EM de estas reacciones se pudo identificar como productos de reacción a los compuestos **46** y **47**, Esquema 2.10, Tabla 2.4.

Respecto a las diferentes condiciones de síntesis detalladas en la Tabla 2.4, se puede destacar que en la reacción *R1* se trabajó en una proporción 1:2 de los reactivos **15**:**31**, ya que fue la condición óptima de síntesis en la reacción con 2-tiohidantoína **16**. Al analizar los crudos de reacción por CG-EM se detectó una gran cantidad de subproductos, lo cual se atribuye al exceso de TFAVE **31**, por lo que en las reacciones *R2* y *R3* se empleó una relación molar de los reactivos **15**:**31** de 1:1,2, observándose un aumento en los rendimientos de los productos **46** y **47**. A su vez, con un aumento en la cantidad de TEA (*R3*, Tabla 2.4) también se logró un incremento en los rendimientos de reacción para ambos productos. Esto puede atribuirse a que, como se comentó en la sección 1.3.2, la acidez de la hidantoína **15** es menor que la del núcleo de 2-tiohidantoína **16**, por lo que al aumentar la proporción de base (TEA) resultó favorable.



Esquema 2.10: trifluorometilación de hidantoína

Tabla 2.4: reacciones de trifluorometilación de hidantoína

Reacción	Hidantoína 15 (mmol)	TFAVE 31 (mmol)	TEA (mL)	Relación 15 : 31 : TEA	Microondas		Rendimientos (%)*	
					Temp. (°C)	Tiempo (min)	46	47
<i>R1</i>	1,56	3,08	0,1	1 : 2 : 0,5	90	15	16	6
<i>R2</i>	2,06	2,41	0,2	1 : 1,2 : 0,7	100	30	25	14
<i>R3</i>	0,52	0,64	0,1	1 : 1,2 : 1,4	100	20	37	22

*Los rendimientos se estimaron a partir de las integraciones por CG.

Por otra parte, resulta importante remarcar que debido a la baja estabilidad de estos productos no pudieron aislarse para completar su caracterización ya que, en numerosos intentos de purificación, los productos de reacción se descompusieron generándose otras sustancias no observadas en el crudo de reacción original. Asimismo, las estructuras de los compuestos **46** y **47** se propusieron por analogía a los sintetizados previamente a partir de 2-tiohidantoína, y por el análisis de los patrones de fragmentación de ambos compuestos, los cuales se ilustran en las Figuras 2.10 y 2.11.

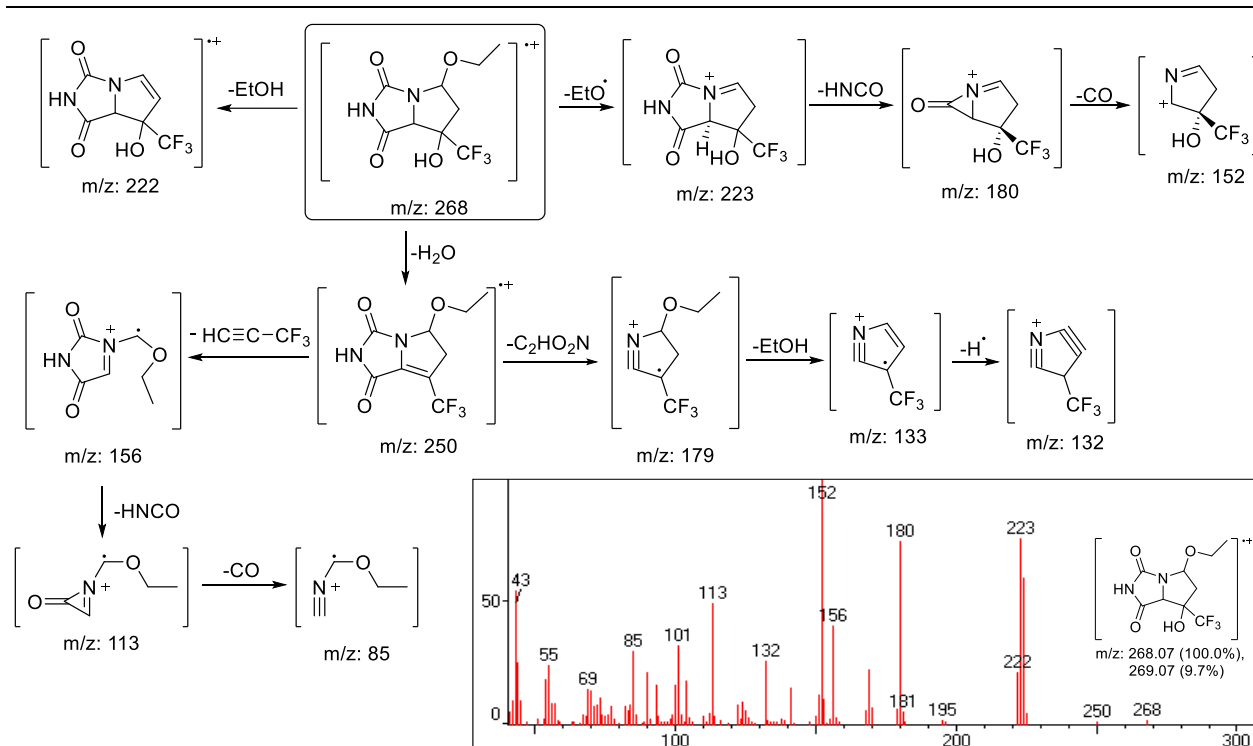


Figura 2.10: patrón de fragmentación de **46**

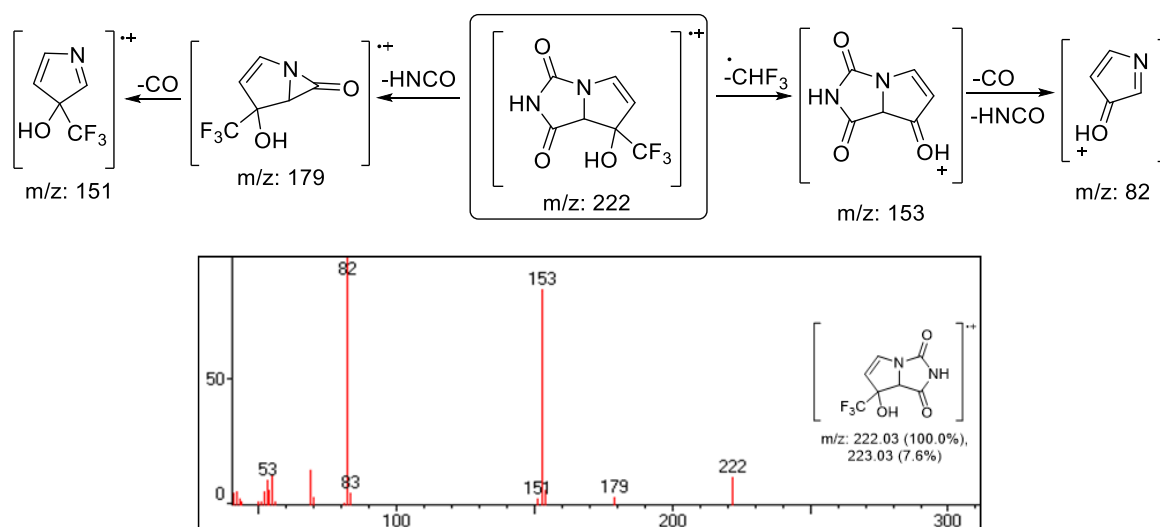
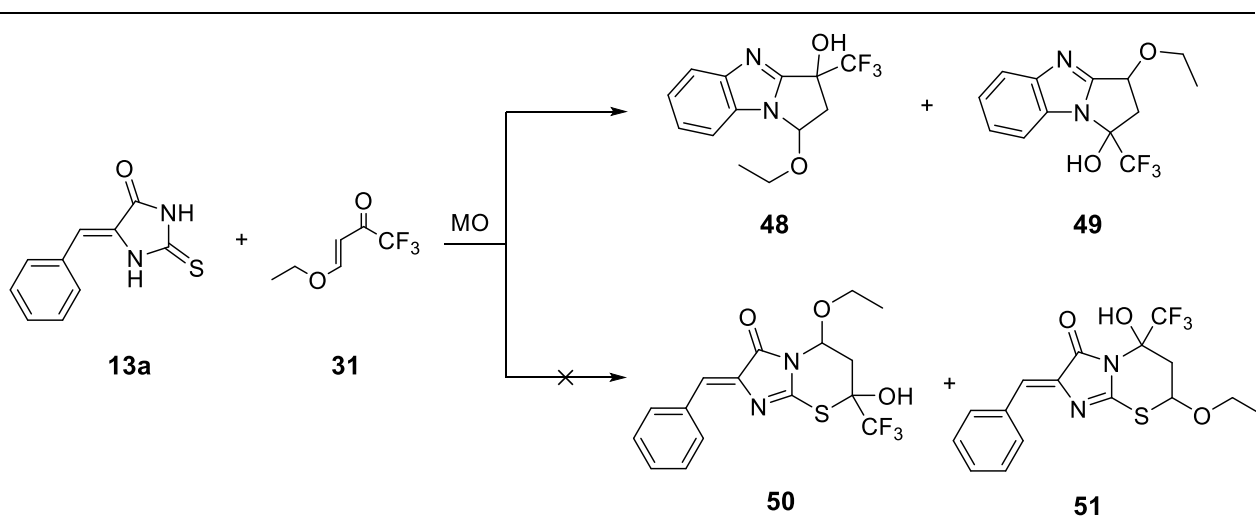


Figura 2.11: patrón de fragmentación del compuesto **47**

2.3.4 Trifluorometilación de 5-benciliden tiohidantoína

Previamente, en el Capítulo 1 se detalló la síntesis y caracterización de 5-benciliden-2-tiohidantoínas (**13a-g**) y su reacción posterior con dicloro etano. En esta sección, con el objetivo de generar nuevos derivados de estos compuestos con una fusión similar a **14(a-c)**, a partir de **13a** y TFAVE **31** se realizaron distintas reacciones. Sin embargo, la obtención de los productos deseados (**50** y **51**), ciclados y análogos a los obtenidos y presentados en el Capítulo 1, no fue exitosa, Esquema 2.11. No obstante, dos productos nuevos e isoméricos (**48** y **49**) fueron detectados en los crudos de las reacciones realizadas, los cuales no poseen el núcleo de tiohidantoína.



Esquema 2.11: reacción de síntesis entre 5-benciliden-2-tiohidantoína **13a** y TFAVE **31**

En la Tabla 2.5 se resumen las reacciones de síntesis por microondas llevadas a cabo. Del análisis de las mismas, se observó que las reacciones *R1a* a *R4* no fueron exitosas, ya que por CG-EM sólo se detectó el sustrato (**13a**); mientras que, al adicionar nitrometano como solvente en las reacciones *R5* y *R6*, se observó el consumo del reactivo limitante y aparición de nuevos productos. De este modo, se determinó que utilizando el núcleo de benciliden tiohidantoína **13a** sólo se logró conducir reacción a la formación de productos al incorporar nitrometano como solvente.

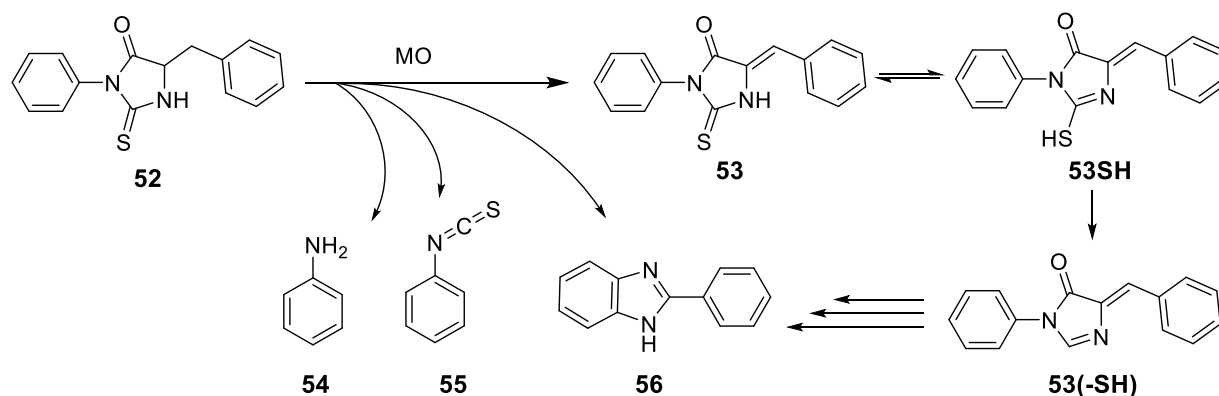
Si bien los productos son nuevos, la reacción carece de valor sintético debido a la inestabilidad de los mismos, los cuales no pudieron aislarse para su caracterización por RMN, y sólo fueron detectados y elucidados mediante CG-EM.

Nuevamente, un profundo análisis de los patrones de fragmentación de las reacciones *R5* y *R6* permitió proponer posibles estructuras para los productos detectados **48** y **49**, que se muestran

Tabla 2.5: reacciones de trifluorometilación de 5-benciliden tiohidantoína

Reacción	13a (mmol)	TFAVE 31 (mmol)	NaHCO ₃ (sat) (mL)	TEA (mL)	ACN (mL)	CH ₃ NO ₂ (mL)	Microondas		Rendimiento (%)
							Temp. (°C)	Tiempo (min)	
R1	0,5	0,58	2	-	-	-	115	10	0
R2	0,5	0,58	2	-	-	-	180	10	0
R3	0,5	0,60	-	0,1	2	-	115	10	0
R4	0,5	0,55	-	0,1	2	-	180	10	0
R5	0,25	0,30	-	0,1	-	2	160	30	27
R6	0,26	0,30	-	0,1	-	2	180	30	27

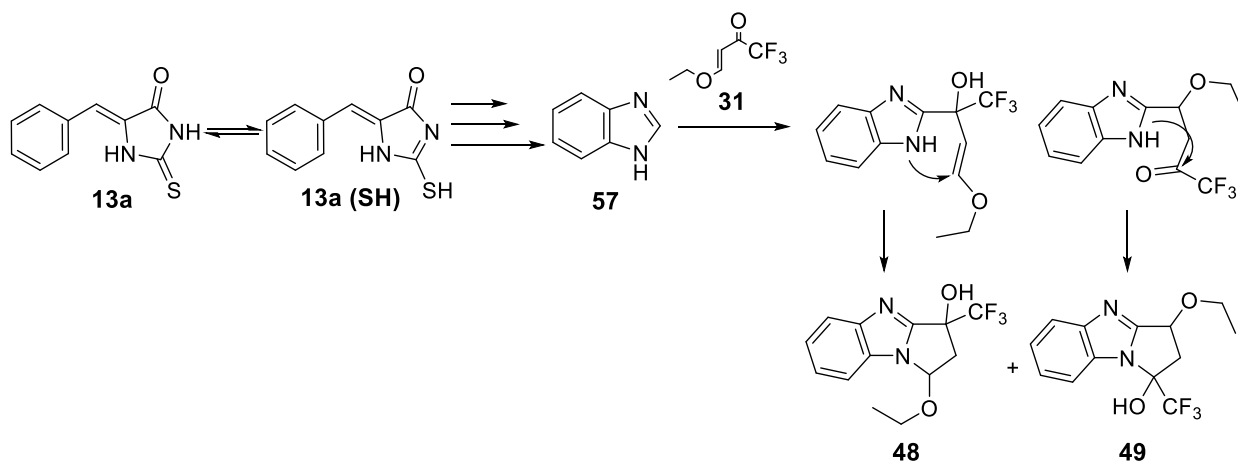
en el Esquema 2.11. Sin embargo, para poder formular los productos de síntesis fue necesario recabar información sobre estudios previos realizados en nuestro laboratorio. Dentro de estos, se ha seguido la deshidrogenación de 5-bencil-3-fenil-tioimidazolin-4-ona **52** por pirólisis inducida por microondas.⁷⁰ En el Esquema 2.12 se resumen los resultados obtenidos, en donde se puede apreciar que si bien el producto principal es el correspondiente a la reacción de deshidrogenación **53**, también se detectaron otros tres productos: anilina **54**, fenilisotiocianato **55** y 2-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol **56**. Cabe mencionar que la formación del benzoimidazol **56** involucra una serie de pasos que a la fecha no son del todo claros, pero experimentalmente se pudo aislar e identificar fehacientemente.



Esquema 2.12: pirólisis inducida por microondas de 5-bencil-3-fenil-tioimidazolin-4-ona **53**

Por lo expuesto anteriormente, proponemos que este tipo de reacciones también ocurren en el proceso de síntesis descrito en el Esquema 2.11, ya que se trata del mismo núcleo. En este sentido, el compuesto **13a** forma un benzoimidazol **57** que posteriormente tiene una sustitución electrofílica

aromática sobre la posición más reactiva del anillo heterocíclico. Seguidamente, como es conocido, una rápida reacción de ciclización intramolecular genera los productos de reacción (Esquema 2.13).



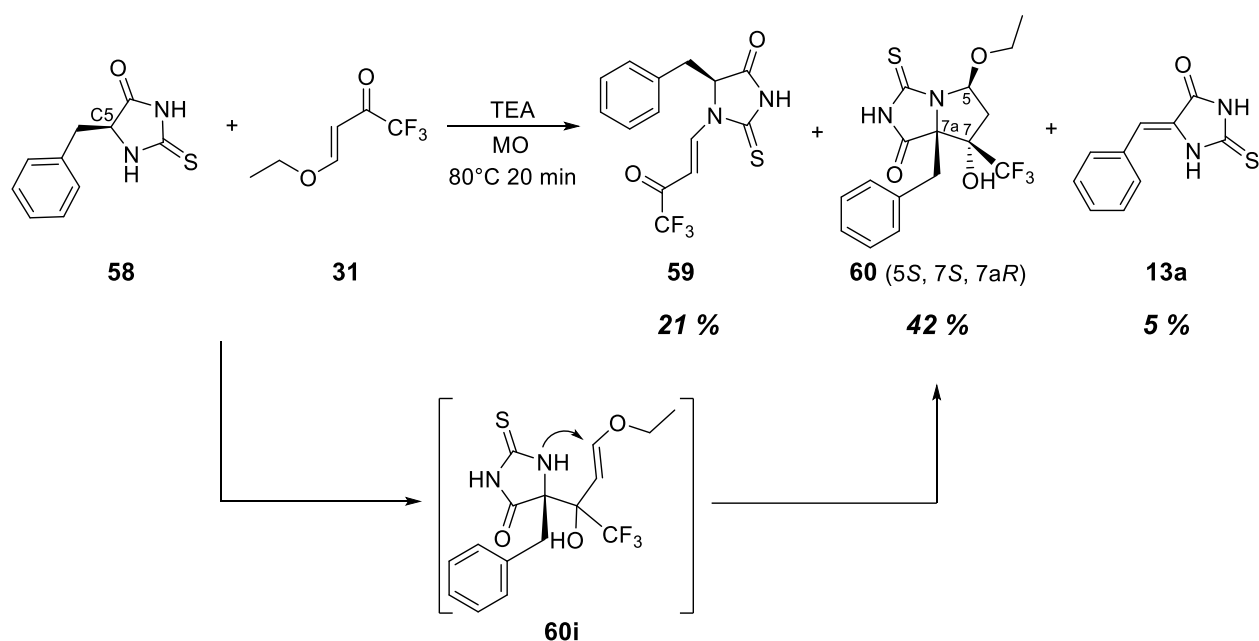
Esquema 2.13: formación de los productos de síntesis **48** y **49**

Cabe señalar que ambos compuestos, **48** y **49**, son isómeros estructurales cuya formación depende de cómo se produzca el ataque electrofílico en la reacción de sustitución electrofílica aromática sobre **57**. Asimismo, resulta necesario explorar otras condiciones de síntesis ya que no se llegó a los compuestos deseados. Si bien al aumentar la temperatura y los tiempos de reacción se logró hacer reaccionar y consumir todo el reactivo **13a**, el mismo se descompuso y un subproducto de éste fue quien reaccionó con el TFAVE **31**.

En relación a los nuevos productos obtenidos, si bien se podrían generar diferentes derivados al partir de diferentes benciliden tiohidantoínas sustituidas (diferentes a **13a**) que den origen a benzimidazoles, los rendimientos globales de reacción no son muy altos provocando que la reacción carezca de interés sintético.

2.3.5 Trifluorometilación de 5-bencil-2-tioimidazolidin-4-ona

En esta sección se trabaja con un heterociclo similar a **13a**, un derivado bencilico de la 2-tiohidantoína (**58**). Este compuesto se sintetizó como ya se había informado previamente;⁵² y se procedió a estudiar su reactividad con TFAVE **31**, como se ilustra en el Esquema 2.14. En esta síntesis se obtienen dos productos principales, uno abierto **59** y otro ciclado **60**, cuyos rendimientos por CG resultaron ser del 21 y 42 %, respectivamente. En este caso, luego de varios pasos de purificación fue posible aislar y separar los productos para su caracterización, pudiendo elucidar la estructura química de los mismos. Los resultados corresponden a lo esperado, ya que a partir de **58** se genera un



Esquema 2.14: reacción de síntesis entre 5-bencil-2-tiohidantoína **58** y TFAVE **31**

carbanión en el C5, dando lugar a la formación del racemato del compuesto ciclado **60**. Este último es análogo al compuesto **40**, pero a diferencia de la reacción del Esquema 2.4, no se puede dar lugar a la formación de un compuesto triciclo-fusionado debido a que la posición ya se encuentra bloqueada por el sustituyente bencilo. Respecto a la posición espacial de este sustituyente en la estructura **60**, se puede proponer que la misma es análoga a la del hidrógeno cabeza de puente de **40**. Con el objetivo de dar mayor sustento a esta propuesta, en el grupo de trabajo se realizaron estimaciones teóricas mediante Gaussian 9.0, a fin de calcular las energías de ambas estructuras posibles, es decir, **60** (5*S*,7*S*,7*aR*) y **60'** (5*S*,7*S*,7*aS*), pues la única variación posible es en el carbono cabeza de puente, C7*a*, ya que el resto de ha de ser estructuralmente análogo a **40** debido a la reactividad del TFAVE **31**. Los resultados fueron congruentes con lo predicho, ya que la estructura **60** (5*S*,7*S*,7*aR*) es 7,3 kcal mol⁻¹ más estable energéticamente que **60'** (5*S*,7*S*,7*aS*).

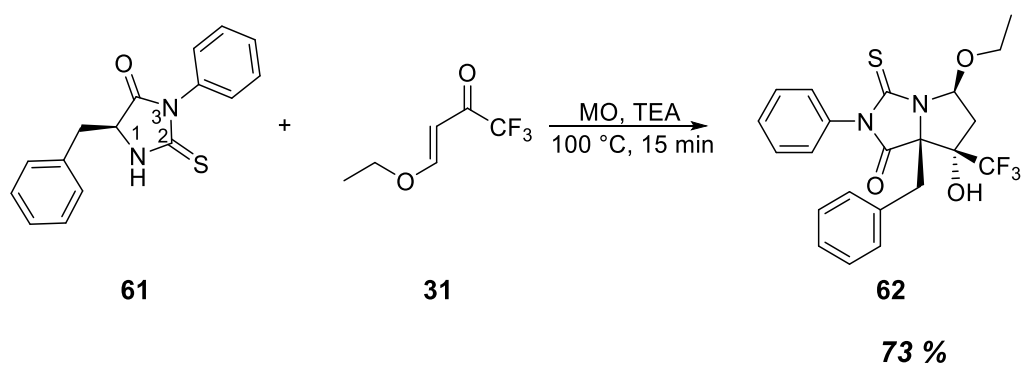
Por otra parte, en esta serie de reacciones de síntesis se identificó por primera vez un compuesto que no culmina con la ciclización intramolecular, pues el derivado **59** resultó del ataque del N1 de **58** al vinilo activo del TFAVE **31**, conservando en el producto final **59** el acetil vinil trifluorometilo, similar al intermediario formado en la vía de síntesis de trifluorometil pirroles.⁷⁶

Por otro lado, en esta reacción se observó que se formaba el producto de deshidrogenación de **58**, es decir, se pudo detectar la presencia de **13a**, el cual es muy fácil de identificar por TLC. Esto se debe a que la deshidrogenación compite con la reacción de síntesis, y al ser un proceso

intramolecular que genera un producto termodinámicamente más estable, su cinética se ve favorecida respecto a la reacción de síntesis. Por este motivo, se trabajó con una mayor proporción de TFAVE **31** respecto al reactivo limitante: **56:31** (1:4). De este modo disminuyó la proporción de **13a** detectándose apenas el 5 % por CG, y la reacción no se vio afectada por subproductos como en la síntesis de la sección 2.3.4.

2.3.6 Trifluorometilación de 5-bencil-3-fenil-2-tioimidazolidin-4-ona

Posteriormente, se sintetizó un análogo a **58**, pero con uno de los nitrógenos del heterociclo (N3) sustituido por un grupo fenilo **61**.⁵² En este caso también se busca incorporar el grupo trifluorometilo mediante el TFAVE **31**, trabajando también con un gran exceso del *building-block* fluorado para evitar la deshidrogenación del enlace exo-cíclico, como se estableció en la reacción anterior, Esquema 2.15.



Esquema 2.15: reacción de síntesis entre 5-bencil-3-fenil-2-tioimidazolidin-4-ona **61** y TFAVE

Cabe destacar, que para esta reacción fue necesario incrementar la temperatura para observar la conversión a productos. Además, la síntesis fue más selectiva a la formación de un producto principal con un rendimiento estimado por CG del 73 %. Debido a la mayor selectividad de esta reacción para la generación de un único producto principal, se logró aislar, purificar y caracterizar el mismo por las técnicas habituales. Debido a que este compuesto no ha podido ser cristalizado para su elucidación estructural por difracción de rayos X, la estereoquímica de los centros quilares fue asignada por analogía a **40**, y al igual que en **60**, los cálculos teóricos arrojaron que la estructura propuesta es más estable energéticamente, en este caso con una diferencia de 7,7 kcal mol⁻¹.

Página en blanco

2.4 CONCLUSIONES

A partir del TFAVE **31** se plantearon diferentes reacciones de trifluorometilación empleando diferentes 1,3-heterociclos como sustrato. El TFAVE **31** se sintetizó exitosamente en el laboratorio y resultó ser un excelente *building block* en la incorporación del grupo trifluorometilo.

En primer lugar, se trabajó con 2-tiohidantoína **16**, y se obtuvieron dos racematos como productos mayoritarios: un biciclo fusionado **40** y un pirano pirrolo triciclo fusionado **41**. Se exploraron las mejores condiciones de síntesis para ambos compuestos, llegando a rendimientos del 68 y 41 %, respectivamente. Además, se identificó un compuesto aromático **44**, el cual se forma en muy bajo rendimiento y sólo pudo ser aislado luego de varios pasos de purificación. Por pirólisis estática se corroboró que la formación de este compuesto aromático proviene de la deshidratación y pérdida de etanol del biciclo **40**.

En cuanto a la caracterización de los compuestos, cabe destacar que el análisis por cristalografía de rayos X resultó crucial en la asignación de los centros quirales de las moléculas **40** y **41** debido al gran número de configuraciones posibles. Además, sin este análisis estructural no hubiese sido posible determinar que la formación de ambos compuestos provienen por vías independientes, y no de forma secuencial como intuitivamente se podría plantear.

En el estudio del mecanismo de reacción, se elucidó que la formación del compuesto **41** proviene principalmente por una vía independiente a la de **40**, en donde se involucra un intermediario zwitteriónico, propuesto a partir de las reacciones llevadas a cabo.

Posteriormente, al trabajar con el análogo oxigenado a la 2-tiohidantoína **16**, la hidantoína **15**, se observó el consumo del sustrato, pero debido a la baja estabilidad de los productos, éstos no pudieron aislarse para su caracterización por las técnicas espectroscópicas habituales. Los productos propuestos surgen de un análisis minucioso de los patrones de fragmentación obtenidos por CG-EM. Del mismo modo, al trabajar con el heterociclo **13a** descrito en el Capítulo 1, los productos obtenidos se descomponen durante la purificación. Además, en esta última síntesis cabe recalcar que el sustrato se descompone en las condiciones de reacción, perdiendo así el interés sintético.

Por último, se sintetizaron por metodologías convencionales dos bencil 1,3-diaza heterociclos: 5-bencil- y 5-bencil-3-fenil -2-tioxoimidazolin-4-ona (**58** y **61**). En ambos casos fue necesario trabajar

con una mayor proporción de TFAVE **31** para disminuir la rápida deshidrogenación intramolecular del sustrato correspondiente. A partir de **58** se obtuvieron dos productos trifluorometilados, uno abierto **59** y otro ciclado **60**, con rendimientos del 21 y 42 %, respectivamente. Mientras que para **61** se obtuvo un único producto bicíclico **62** con un rendimiento del 73 %.

Por otra parte, resulta interesante destacar que sólo en una de las reacciones de trifluorometilación con TFAVE **31** se observó la clásica pérdida de etanol como se puede apreciar en publicaciones recientes.^{78,79}

En resumen, a pesar de las dificultades en la síntesis de compuestos alifáticos, en este capítulo enfocado en la incorporación del grupo trifluorometilo a compuestos heterocíclicos, se lograron sintetizar cinco compuestos nóveles, no descritos hasta el momento. Queda pendiente evaluar sus potenciales actividades biológicas, las cuales suelen ser prometedoras al incorporar grupos fluorados.

2.5 SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.5.1 Síntesis de TFAVE 31

Primeramente, en un baño de hielo se adecua un balón de tres bocas donde se incorpora 9,5 mL (68 mmol) de anhídrido trifluoroacético [ATFA, (CF₃CO)₂O]. Mediante una ampolla con brazo compensador conectada al balón se adiciona en primer lugar 5 mL (51 mmol) de α -picolina (C₆H₇N) en agitación; posteriormente se incorpora gota a gota 5,5 mL (73 mmol) de vinil etil éter. Desde el inicio, y debido a que la reacción es muy exotérmica y los sustratos son muy reactivos, es importante mantener el sistema en atmósfera inerte (N₂) y realizar los agregados muy lentamente. Posteriormente se incorporaron 15 mL de éter etílico (EE) y luego se deja un día en agitación a temperatura ambiente.

A diferencia de la metodología informada, se empleó α -picolina en lugar de piridina (C₅H₅N), y de este modo se evitó la formación del precipitado blanco de la sal de piridonio al incorporarse los reactivos, ahorrando así un paso de filtración. Luego de aproximadamente 24 h de agitación, se incorporan 45 mL de EE y se evapora a baja temperatura para eliminar lo que quede de etil vinil éter sin reaccionar. Luego, para eliminar α -picolina, se extrae con CH₂Cl₂ (45 mL) y 3 x 45 mL HCl 1 M, y finalmente se enjuaga con H₂O purificada. Se destila la fase orgánica y por RMN-¹H y -¹⁹F se corrobora la estructura y pureza del TFAVE 31.

2.5.2 Síntesis de 5-bencil-2-tioxoimidazolidin-4-ona 58

Para la síntesis de 58 se siguieron los procedimientos ya publicados.⁵² En un vial para microondas de 10 mL se incorporaron 209 mg (1,21 mmol) de L-fenilalanina, 261 mg (3,62 mmol) de tiourea, 12 mg (0,035 mmol) de perclorato de *tert*-butilamonio. La síntesis se llevó a cabo asistida por microondas. Primero se calentó a 30 °C durante 30 segundos en agitación a 1200 rpm, luego se elevó la temperatura a 190 °C durante 15 minutos, y finalmente se enfrió a 45°C.

Luego de que el crudo de reacción alcanzara temperatura ambiente, se incorporó 15 mL de H₂O purificada y se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). Se recuperó la fase orgánica y se secó con CaCl₂ anhidro. Se purificó realizando un pre-filtrado en columna, eluyendo con los siguientes solventes: n-C₆H₁₄, CHCl₃, AcOEt, en polaridad creciente. La fase móvil de separación es CHCl₃:AcOEt (70 : 30). Por RMN-¹H se corroboró la estructura y pureza de 58.

2.5.3 Síntesis de 5-bencil-3-fenil-2-tioximidazolidin-4-ona **61**.

Para la síntesis de **61** se siguieron los procedimientos ya publicados.⁷⁰ A diferencia de las síntesis anteriores, ésta se llevó a cabo por métodos convencionales. En un balón se incorporaron 715 mg (4,33 mmol) de L-fenilalanina disuelta en 60 mL de una mezcla acetona/agua (50:50), posteriormente se agregaron 637 mg (4,72 mmol) de fenilisotiocianato y finalmente se adicionaron 266 mg de NaOH disueltos en 3 mL de H₂O. Seguidamente, se inició el calentamiento a reflujo durante 2 h con agitación magnética. Se dejó una semana a temperatura ambiente para que cristalizara. Finalmente, se filtró al vacío lavando con H₂O y se secó en estufa a 30 °C. Por RMN-¹H se corroboró la estructura y pureza de **61**.

2.5.4 Reacciones de síntesis de trifluorometilación

Las reacciones de síntesis asistidas por MO, se realizaron con el equipamiento descrito en el Capítulo 1. Los reactivos se incorporaron en un vial de borosilicato para MO de 10 mL. En todos los casos se empleó el mismo método de síntesis, siempre con agitación magnética a 1200 rpm. Primero se calentó a 30 °C manteniendo la temperatura durante 30 segundos, posteriormente se irradia a la potencia de MO necesaria para llegar a la temperatura deseada, manteniendo la misma en el tiempo requerido, para finalmente enfriar a 45 °C. Los detalles experimentales de cada reacción de síntesis se han explicitado en la sección de Resultados y Discusión, aquí se reescriben las mejores condiciones de síntesis exploradas.

2.5.4.1 Síntesis de 5-etoxi-7-hidroxi-3-tioxo-7-(trifluorometil)hexahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1-ona **40** y 5,10-dietoxi-8-hidroxi-3-tioxo-6a,8-bis(trifluorometil)hexahidro-1*H*,5*H*,8*H*-pirano[3',2':2,3]pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1-ona **41**

Los reactivos se incorporaron en el siguiente orden, 150 mg (1,29 mmol) de 2-tiohidantoína **16**, 434 mg (5,59 mmol) de TFAVE **31** y 0,1 mL de TEA. Para guiar la reacción a la formación de **40** se calentó a 80 °C durante 20 minutos, con un rendimiento del 68 %. Por otra parte, para dirigir la reacción a la formación de **41** se calentó a 90 °C durante 15 minutos, con un rendimiento del 41 %.

Luego de que el crudo de reacción alcanzara la temperatura ambiente se disolvió el mismo con 15 mL de AcOEt y se extrajo 3 x 15 mL de HCl 0,4 M. Se recuperó la fase orgánica y se secó con

Na₂SO₄ anhidro. Se purificó mediante cromatografía en columna empleando los siguientes solventes: n-C₆H₁₄, CH₂Cl₂, AcOEt, en polaridad creciente. La fase móvil de separación es CH₂Cl₂:AcOEt (80:20); primero eluye el compuesto **40** y luego el **41**.

2.5.4.2 Síntesis de 5-etoxi-7-hidroxi-7-(trifluorometil)tetrahydro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1,3(2*H*)-diona **46** y 7-hidroxi-7-(trifluorometil)-7,7a-dihidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1,3(2*H*)-diona **47**.

Los reactivos se incorporaron en el siguiente orden, 206 mg (2,06 mmol) de hidantoína **15**, 405 mg (2,41 mmol) de TFAVE **31** y 0,2 mL de TEA. Posteriormente, se calentó a 100 °C durante 30 minutos, con un rendimiento del 25 y 14 % para **46** y **47**, respectivamente

Luego de que el crudo de reacción alcanzara la temperatura ambiente se disolvió el mismo con 15 mL de AcOEt y se extrajo 3 x 15 mL de HCl 0,4 M, con agregados de NaCl para aumentar la fuerza iónica. Se recuperó la fase orgánica y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se purificó mediante cromatografía en columna empleando los siguientes solventes: EP, CHCl₃, AcOEt, en polaridad creciente. La purificación no fue exitosa ya que se generaron nuevos subproductos durante la misma.

2.5.4.3 Síntesis de 5-bencil-2-tioxi-1-(4,4,4-trifluoro-3-oxobut-1-en-1-il)imidazolidin-4-ona **59** y 7a-bencil-5-etoxi-7-hidroxi-3-tioxi-7-(trifluorometil)hexahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1-ona **60**.

A partir del compuesto **58**, sintetizado y purificado previamente, se sintetizaron los compuestos **59** y **60**. En un vial se incorporaron 96 mg (0,47 mmol) de 5-bencil-2-tioxiimidazolidin-4-ona **58**, 326 mg (1,94 mmol) de TFAVE **31** y 80 µL de TEA. Se calentó a 80 °C durante 20 minutos. Los rendimientos fueron del 21 y 42 % para **59** y **60**, respectivamente.

Luego de que el crudo de reacción alcanzara la temperatura ambiente, se disolvió en 15 mL de AcOEt y se extrajo con HCl 0,01 M (3 x 15 mL). Se recuperó la fase orgánica y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se purificó en varios pasos; primeramente se realizó una pre-columna eluyendo con n-hexano, CH₂Cl₂, AcOEt, en polaridad creciente; posteriormente se realizó una cromatografía en placa preparativa disolviendo la muestra en una mezcla de EE y AcOEt y eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH (99:1)

2.5.4.4 Síntesis de 7a-bencil-5-etoxi-7-hidroxi-2-fenil-3-tioxo-7-(trifluorometil) hexahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1-ona **62**.

El compuesto **62** se sintetizó a partir del compuesto **61** purificado previamente. En un vial de 10 mL se incorporaron 150 mg (0,53 mmol) de 5-bencil-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-4-ona **61**, 198 mg (1,18 mmol) de TFAVE **31** y 0,4 mL de TEA. Se calentó a 100 °C durante 15 minutos, generando el compuesto **62** con un 73 % de rendimiento. Luego de que el crudo de reacción alcanzara la temperatura ambiente se disolvió con 15 mL de AcOEt y se extrajo con HCl 0,01 M (2 x 15 mL) y HCl 0,5 M (1 x 15 mL). Posteriormente, se recuperó la fase orgánica y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Finalmente se purificó realizando una pre-columna eluyendo con n-hexano, CHCl₃, AcOEt, en polaridad creciente. La fase móvil de separación fue CHCl₃:AcOEt (95:5).

2.5.5 Mediciones polarimétricas de **40** y **41**

La rotación óptica fue medida en un Polarímetro JASCO P-1010 Digital. Se empleó la línea-D de sodio a 589 nm. Las soluciones de **40** (0,011 g/mL) y **41** (3,2 · 10⁻⁴ g/mL) fueron preparadas en acetonitrilo y medidas a 21 °C por quintuplicado. Se empleó una solución S(+)-Carvona (0,01 g/mL) como control de laboratorio [α]_D²³ = +55.

2.5.6 Determinaciones por HPLC

Se empleó un equipo de HPLC Waters 1525 con detector de PDA, columna C18 de fase reversa. Las muestras se prepararon a una concentración de 0,2 mg/mL. Se emplearon diferentes fases móviles para la cuantificación (ACN/H₂O, MeOH/H₂O, a distintas proporciones), pero sólo se consiguió separar las señales de **41** y **42** con la mezcla MeOH:H₂O (80:20).

2.5.7 Determinaciones cristalográficas

2.5.7.2 Elucidación de **40** por rayos X

Para la cristalización de **40** se solubilizó el mismo en una mezcla de AcOEt y unas gotas de THF, calentando cuidadosamente, posteriormente se filtró y se dejó cristalizar a temperatura ambiente.

Los datos cristalográficos se obtuvieron en la Universidad de Carolina del Sur (EEUU), a gentileza de la Dr. Natalia B. Shustova. Los datos fueron colectados a 100(2) K, empleando un difractorómetro

Bruker D8 QUEST equipado con un detector PHOTON-100 CMOS y una fuente microfoco Incoatec (radiación MoK α , $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).

2.5.7.2 Elucidación de **41** por rayos X

Para la cristalización del compuesto **41** se realizaron en una mezcla de CH₂Cl₂ y AcOEt a temperatura ambiente.

Los datos cristalográficos se obtuvieron en la Universidad de Vigo (España). Las adquisiciones se realizaron a 110 K empleando un difractómetro Bruker D8 Venture con detector Photon 100CMOS y radiación MoK α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).

Página en blanco

Capítulo 3

Estudios de las actividades biológicas de
benciliden (tio)oxoimidazolidinonas

Página en blanco

3.1 INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de un fármaco de uso medicinal se deben seguir una serie de etapas muy bien definidas, las cuales hay que cumplimentar rigurosamente en forma secuencial hasta que el principio activo en estudio sea considerado seguro, y haya alcanzado las aprobaciones legales por los entes regulatorios correspondientes. Estas etapas se indican en la Figura 3.1,^e donde se inicia con un curso **exploratorio** para luego continuar con las distintas fases del **confirmatorio**. Primeramente, se realizan distintos ensayos químicos, caracterizando el compuesto de interés, y mediante distintos estudios *in vitro* se determinan sus potencialidades. Posteriormente, se experimenta con algún modelo animal que sea representativo a la diana de interés, para recién en la **Prueba de Concepto** trabajar con un grupo reducido de personas para así proseguir con las etapas confirmatorias.

En este trabajo de tesis se exploró la actividad biológica de las moléculas sintetizadas en el Capítulo 1, con el objetivo de indagar respecto a sus propiedades. En este sentido, continuando con los conceptos involucrados en el desarrollo de un fármaco, nos ubicamos en el inicio de la exploración para la selección de un potencial candidato. Para ello se realizó una pasantía en la Universidad Federal de Piauí (Brasil) por medio de un convenio bilateral MinCyT-Capes, siendo el director argentino el Dr. Walter Peláez y el director brasilero el Dr. Rivelilson Freitas (código del proyecto: BR/13/18). De este modo, de los compuestos sintetizados se realizaron diferentes ensayos para evaluar, en primera instancia, su toxicidad, el potencial antioxidante y su actividad microbiana, los cuales se resumen en la Figura 3.2.

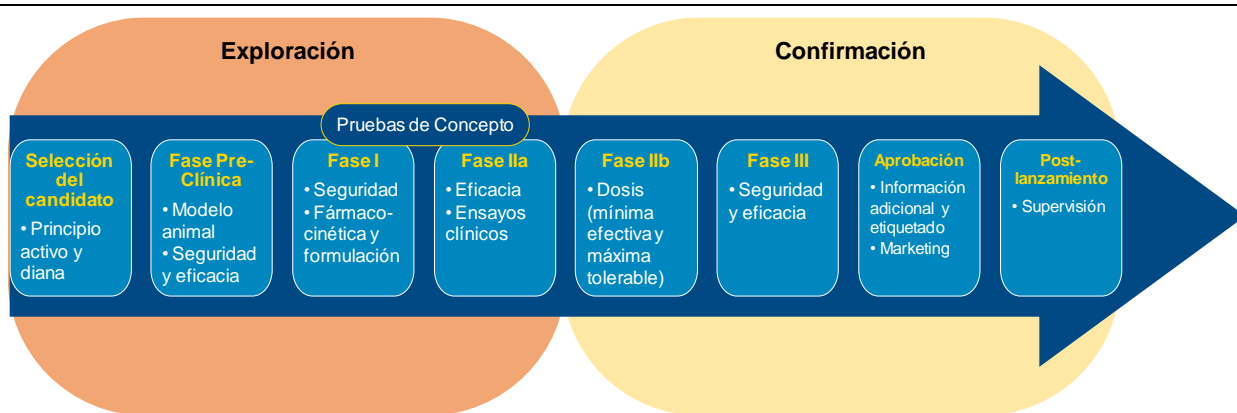


Figura 3.1: fases en el desarrollo de un fármaco, del laboratorio a la clínica

^e Curso de doctorado: “Simulación Informática del Descubrimiento y Desarrollo de Drogas: desde el Laboratorio a la Clínica” Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. 2015. RES HCD:881/2015.

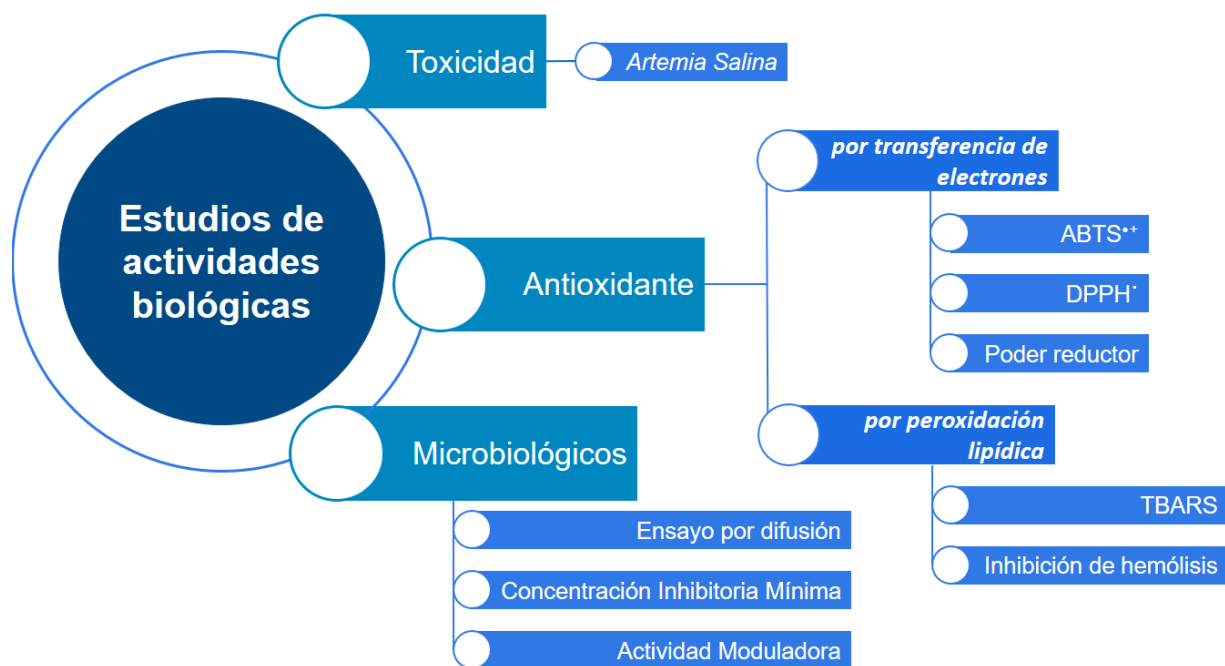


Figura 3.2: resumen de los ensayos biológicos llevados a cabo en este capítulo

Se ha reconocido ampliamente la importancia de los procesos oxidativos en el cuerpo humano como así también en los alimentos. El metabolismo oxidativo es esencial para la supervivencia de las células, pero un efecto colateral es la producción de radicales libres y otras **especies reactivas del oxígeno** (ROS, *reactive oxygen species*) como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete ($O_2^1\Delta g$) y los radicales: hidroxilo ($\cdot OH$), peroxilo ($ROO\cdot$) y alcoxi ($RO\cdot$). Estas especies son muy reactivas y producen cambios oxidativos que atacan a macromoléculas biológicas, dañando proteínas, lípidos y ADN.^{83,84} Por ejemplo, cuando se alcanza una elevada concentración de radicales libres, se dañan enzimas protectoras como la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa con efectos destructivos y letales sobre las células.⁸⁵

En plantas y animales, los antioxidantes desactivan estos radicales libres, actuando como inhibidores de los procesos de oxidación. Tal es su relevancia, que inclusive a muy bajas concentraciones juegan diversos roles fisiológicos en el ser humano.⁸³ Dentro de este marco, un **antioxidante** puede ser definido como cualquier sustancia que a bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrase o inhiba significativamente la oxidación del sustrato.⁸⁶ En otras palabras, los antioxidantes cumplen un rol protector ante ciertas condiciones en donde se generen ROS.

En la actualidad se han desarrollado diferentes metodologías químicas para evaluar la actividad antioxidante de determinados compuestos. Debido a la variabilidad de los resultados que se obtienen

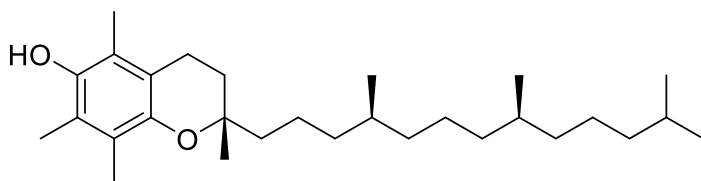
entre los diferentes ensayos, al estudiar un determinado compuesto con potencial actividad, resulta necesario realizar determinaciones aplicando diferentes metodologías para así vislumbrar algunas conclusiones con cierto grado de confianza. Este tipo de pruebas químicas no suelen ser de extrapolación directa con los ensayos *in vivo* que se realizan en una segunda instancia.⁸⁵

En todos los ensayos antioxidantes se producen un gran número de reacciones químicas, pero sólo una de ellas es la que nos permite determinar la capacidad antioxidante de un dado compuesto. En esta reacción se produce un cambio, el cual se puede medir por alguna técnica confiable, como puede ser un cambio de color que sea fácil de seguir por espectrofotometría UV-vis. Según cuál sea el mecanismo de esta reacción, se pueden clasificar los ensayos antioxidantes en tres grandes grupos: por transferencia de electrones, por transferencia de un átomo de hidrógeno y por peroxidación lipídica; como se indicó en la Figura 3.2.

En los **ensayos por transferencia de electrones**, por lo general, ocurre una reacción redox y se mide la oxidación durante un período de tiempo fijo. Este método se basa en una reacción de transferencia de electrones, involucrando a dos componentes en la mezcla de reacción: el antioxidante y el oxidante, en donde el primero se oxida y el segundo se reduce. Este proceso por lo general produce un cambio de color que es proporcional a la concentración del antioxidante. Los ensayos basados en la **transferencia de un átomo de hidrógeno** son similares al anterior, con la diferencia que los radicales se neutralizan por la donación de un átomo de hidrógeno.⁸⁷

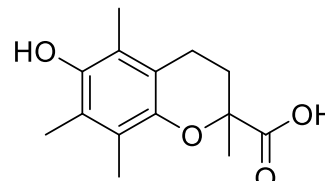
Por otro lado, los **ensayos antioxidantes lipídicos** son de gran relevancia en el deterioro de alimentos y en las modificaciones oxidativas de la lipoproteína de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*). La oxidación lipídica procede principalmente por tres vías: (a) reacciones en cadena mediadas por radicales libres; (b) foto-oxidaciones no radicalarias; (c) y reacciones enzimáticas.⁸⁵

En un ensayo antioxidante hay tres componentes que son comunes para todos los procedimientos: un **iniciador** de la oxidación, un **sustrato** apropiado, como así también una **técnica** adecuada para medir el punto final del proceso.⁸⁵ Por otra parte, para estimar el potencial antioxidante es necesario usar un estándar. Uno de los más usados como control positivo es un análogo a la vitamina E **63**, denominado **Trolox** (ácido 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) **64**, cuyas estructuras se ilustran en la Figura 3.3.



63

Vitamina E



64

Trolox

Figura 3.3: estructura química de la Vitamina E **63** (izquierda) y del Trolox **64** (derecha)

Al analizar los resultados de un ensayo antioxidante, resulta imprescindible considerar los cambios químicos que se están midiendo, como así también sus fundamentos. Por este motivo, para cada ensayo realizado se explicitan los procesos químicos involucrados en cada caso para una mejor comprensión de las determinaciones realizadas.

Por otra parte, se estudió la toxicidad contra *Artemia Salina* de los compuestos sintetizados. Estos crustáceos son un componente de la fauna de los ecosistemas marinos y acuáticos salinos, siendo en parte, los responsables del color rosado de los flamencos.^{88,89} A su vez, son muy sensibles a las alteraciones de su medio, y es por ello que son ampliamente usados para evaluar la toxicidad de compuestos químicos ya sean sintéticos o naturales.^{90,91} Además, como modelo de laboratorio, presentan un gran número de ventajas: son muy fáciles de cultivar, crecen en tiempos muy cortos, comercialmente son fáciles de obtener y sus huevos se pueden almacenar por diez años.⁹²

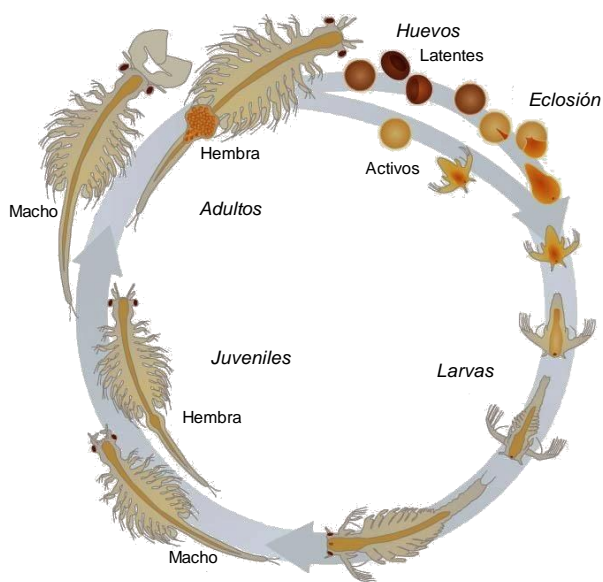


Figura 3.4: ciclo de vida de *Artemia Salina*.

En el ciclo de vida de la *Artemia Salina* se pueden distinguir varias etapas de madurez, desde la eclosión de los huevos hasta su forma adulta en donde se puede diferenciar claramente el macho de la hembra; Figura 3.4. Los ensayos de toxicidad, por lo general, se realizan sobre las *Artemias* en su etapa como larva, ya que al ser más jóvenes son más sensibles a la toxicidad de un compuesto químico.⁹³

Además, se realizaron distintos experimentos para investigar la actividad

microbiológica de estos compuestos, y así conocer sus potenciales aplicaciones contra bacterias patógenas. Uno de los parámetros que se determinan en primera instancia es la **Concentración Inhibitoria Mínima** (MIC, *Minimun Inhibitory Concentration*). La MIC se define como la concentración más baja de una sustancia que logra inhibir visiblemente el crecimiento de un microorganismo luego de incubarlo. De este modo, se puede conocer si el compuesto en estudio posee un efecto bacteriostático ante una determinada cepa bacteriana. Asimismo, si se desea conocer su potencial como bactericida, se puede determinar la **Mínima Concentración Bactericida** (MBC, *Minimun Bactericidal Concentration*), que es la concentración más baja en la que se logra prevenir el crecimiento de un organismo luego de un sub-cultivo en un medio libre del fármaco en estudio. En muchos laboratorios de diagnóstico se determinan las MIC *in vitro* en la búsqueda de nuevos antimicrobiales, mientras que la MBC se determinan con menos frecuencia, y principalmente se realiza a partir de la muestra de sangre de algunos pacientes hospitalarios.⁹⁴

Actualmente, hay una creciente preocupación por parte de la comunidad científica y sanitaria debido al incremento de microorganismos que han desarrollado resistencia a los tratamientos antimicrobiales, especialmente por aquellas cepas que presentan resistencia a múltiples fármacos. Esto no es un fenómeno nuevo, pues las empresas farmacéuticas no han demostrado interés en el desarrollo de nuevos antibióticos ya que argumentan que no son lo suficientemente lucrativos.⁹⁵ Sumado a esto, debido a la resistencia desarrollada por algunas cepas bacterianas, es creciente el interés por el desarrollo de nuevos antimicrobianos, como así también de fármacos que potencien la actividad de los antibióticos comerciales. Con respecto a este último ítem, se han puesto a punto distintos ensayos de laboratorio para estudiar la **actividad moduladora** de un fármaco en la inhibición del crecimiento bacteriano. En este tipo de estudios se trabaja con una cepa resistente a un antibiótico, y se evalúa la acción de un fármaco en sinergia con el antibiótico. De este modo se logra que la bacteria presente nuevamente sensibilidad al antibiótico, se disminuya la dosis del mismo, posibilitando así una reducción en los efectos adversos debidos a la toxicidad de los antibióticos. Además, se ha demostrado que el uso de este tipo de compuestos con un antibiótico retrasa el desarrollo de resistencia por parte de la bacteria.⁹⁶

Por lo mencionado anteriormente, se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) mediante dos tipos de ensayos: (a) **Microdilución**, y (b) **Difusión**. En el segundo caso, se requiere que el compuesto difunda por el medio de cultivo, para lo cual es necesario que sea muy soluble en medio

acuoso para poder detectar su efecto bacteriostático; mientras que el ensayo por microdilución resulta más conveniente cuando las muestras en estudio no son muy solubles en un medio de cultivo. Posteriormente, a aquellas moléculas que exhibieron una menor MIC se les estudió la actividad moduladora con Norfloxacin en una cepa de *Staphylococcus aureus* que tiene sobre-expresada una proteína de eflujo (NorA), la cual no permite que el antibiótico ejerza su acción contra la bacteria. De este modo, se puede conocer si las moléculas en estudio son capaces de restituir o potenciar la actividad del antibiótico.

En resumen, en este Capítulo se exploraron diferentes actividades biológicas para conocer las propiedades y potenciales aplicaciones de las moléculas sintetizadas, evaluando por diferentes ensayos la actividad antioxidante, la toxicidad contra *Artemia Salina*, y la inhibición al crecimiento bacteriano como posibles antimicrobianos como así también en sinergia con un antibiótico comercial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Estudiar la capacidad antioxidante de las distintas moléculas sintetizadas (Figura 3.5) mediante ensayos por transferencia de electrones y por peroxidación lipídica.
- ii) Testear la toxicidad de estos compuestos contra *Artemia Salina*.
- iii) Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de todos los compuestos mediante ensayos por difusión y microdilución.
- iv) Indagar la actividad moduladora de los compuestos que presenten una baja MIC, a concentraciones sub-inhedoras con Norfloxacin, frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* SA1199B.

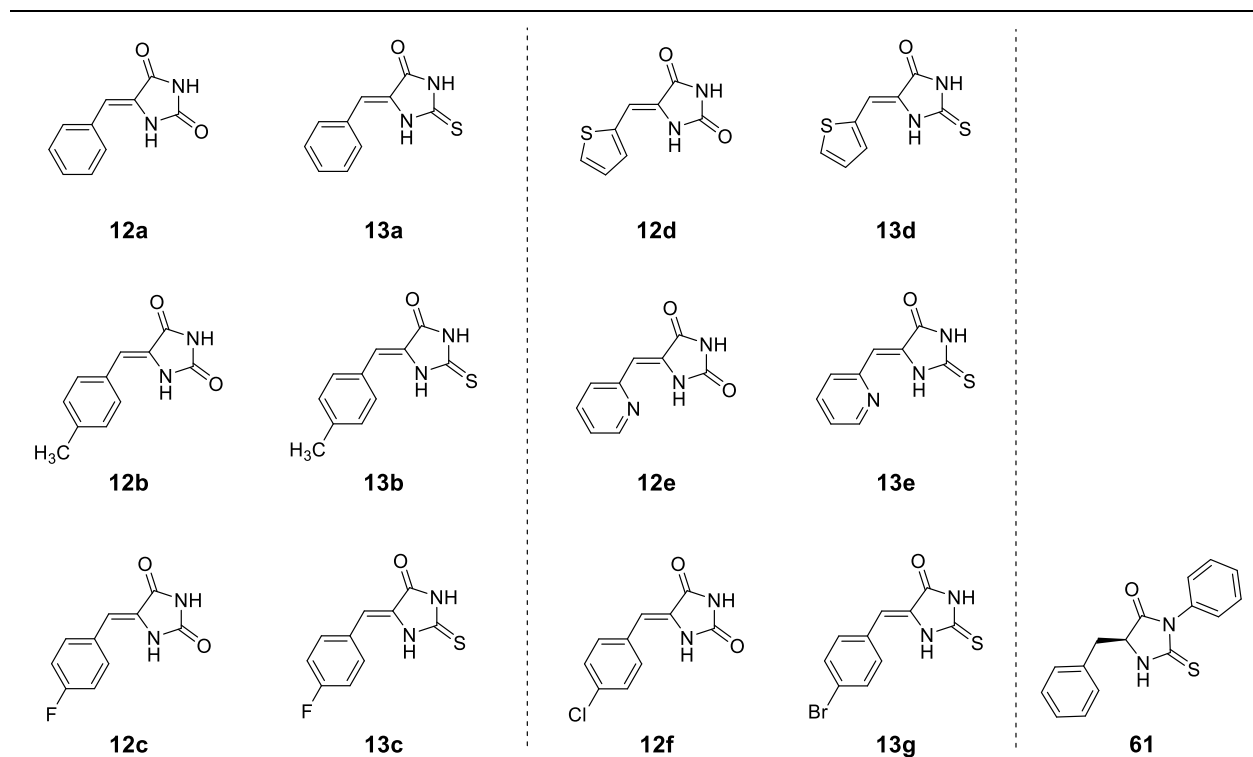


Figura 3.5: 1,3 heterociclos sintetizados y estudiados en este capítulo.

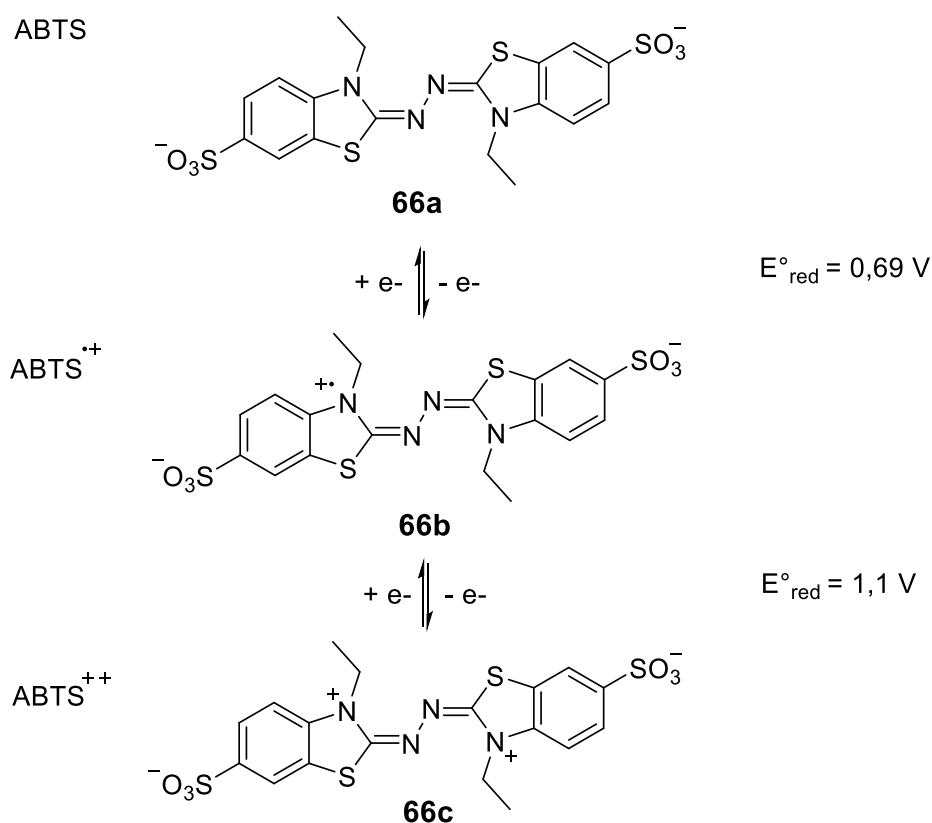
Página en blanco

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Ensayos antioxidantes

3.3.1.1 Radical catiónico ABTS^{•+}

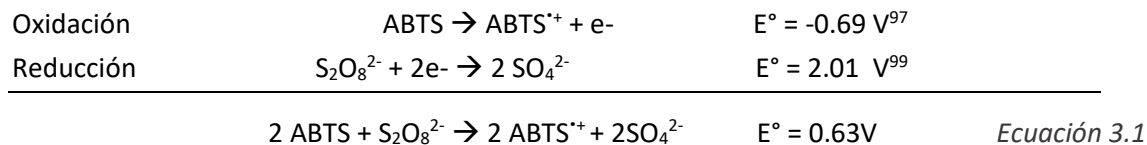
El ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) **66** es un compuesto incoloro, muy soluble en agua y químicamente estable. A su vez, el ABTS posee propiedades electroquímicas muy interesantes ya que puede sufrir transformaciones redox reversibles como se indican en el Esquema 3.1. A partir de una solución de ABTS es posible obtener el radical catión (ABTS^{•+}) de una coloración azulada. Posteriormente, y ante una segunda oxidación se obtiene una solución rojiza debido al dicatión, ABTS⁺⁺, el cual no es de interés debido a su baja estabilidad.⁹⁷



Esquema 3.1: estados de oxidación del ABTS⁹⁸

El ABTS se puede adquirir fácilmente ya que se consigue comercialmente, y a partir de una solución del mismo existen muchas maneras de producir el ABTS^{•+}. Algunos protocolos estandarizados involucran un camino enzimático, siguiendo los cambios por espectrofotometría

UV-vis;⁹⁸ mientras que otra alternativa consiste en la oxidación del ABTS con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), por medio de las reacciones que se indican en las siguientes ecuaciones químicas:



Esta última fue la metodología empleada en este trabajo para generar el $ABTS^{*+}$, considerando la relación estequiométrica de la Ecuación 3.1. Por otra parte, el cromóforo $ABTS^{*+}$ posee varias bandas de absorción, las cuales se localizan a 415, 645, 734 y 815 nm. Se ha observado que al realizar las determinaciones a 734 nm se minimizan las interferencias de otros compuestos;⁸⁵ por este motivo, para evaluar la capacidad antioxidante se sigue el decaimiento de la absorbancia a 734 nm, lo cual indica que se está reduciendo la especie radicalaria. De este modo, la absorbancia del control negativo (A_{CN}) es mayor que la de una muestra (A_{mezcla}) que presenta actividad antioxidante; por lo tanto, A_{CN} se emplea como punto de referencia para el cálculo del porcentaje de inhibición del $ABTS^{*+}$, como se explicita en la Ecuación 3.2. Además, para validar el ensayo se realizó un control positivo con Trolox **64**, a las mismas concentraciones que los compuestos en estudio.

$$\% \text{ de inhibición del } ABTS^{*+} = [(A_{CN} - A_{mezcla}) / (A_{CN})] \times 100 \% \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde A_{CN} es la absorbancia del control negativo, y A_{mezcla} la correspondiente a la muestra en estudio.

Por lo mencionado anteriormente, al comparar diferentes muestras, aquella que en una misma concentración logre un mayor decaimiento de la absorbancia, mayor será la inhibición del $ABTS^{*+}$, y por ende, su capacidad antioxidante será mayor.

Los resultados de este ensayo se informan en la Tabla 3.1, donde se puede comparar el porcentaje de inhibición del $ABTS^{*+}$ para cada uno de los compuestos estudiados. De la misma, se puede apreciar que para los heterociclos con un núcleo de hidantoína el porcentaje de inhibición es menor que para sus contrapartes azufradas. De hecho, los compuestos que presentaron una mayor capacidad antioxidante en este ensayo fueron **13(a-d)**, con una excepcional actuación de los compuestos **13c** y **13d** que poseen sustituyentes *p*-flúorbencilo y tiofenilo, respectivamente.

Tabla 3.1: porcentajes de inhibición del radical catión ABTS^{•+}

Compuestos	100 μ M		250 μ M		500 μ M	
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
12a	4,9	\pm 0,9	12,15	\pm 0,08	22	\pm 2
12b	56,6	\pm 0,3	70,6	\pm 0,5	77	\pm 1
12c	6,3	\pm 0,4	21	\pm 1	33	\pm 1
12d	3,7	\pm 0,6	19	\pm 1	28	\pm 2
12e	20	\pm 0,4	35,3	\pm 0,2	49,3	\pm 0,6
12f	28,2	\pm 0,3	25	\pm 5	*	*
13a	73	\pm 4	94,5	\pm 0,5	*	*
13b	82	\pm 3	87	\pm 1	*	*
13c	100	\pm 0,02	99,69	\pm 0,02	98,97	\pm 0,01
13d	99,8	\pm 0,2	99,93	\pm 0,04	99,97	\pm 0,02
13e	11,88	\pm 0,02	31,3	\pm 0,5	51,2	\pm 0,5
13g	76	\pm 2	79	\pm 2	*	*
61	32	\pm 1	64,84	\pm 0,06	96	\pm 1
Trolox	98	\pm 2	98	\pm 2	98	\pm 2

*Los valores no se informan ya que las muestras precipitaron a esas concentraciones.

3.3.1.2 Radical DPPH[•]

El DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidracil) **67** es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables y disponibles comercialmente, el cual se distingue por no requerir de una reacción previa para generar la especie radicalaria. Se caracteriza por un color púrpura intenso, con un máximo de absorción a 517 nm. Además, debido a su estabilidad, es empleado como estándar de referencia en la espectroscopia por resonancia paramagnética electrónica. En cuanto a la reactividad del DPPH[•], se puede mencionar que reacciona más lentamente que el ABTS^{•+} debido al impedimento estérico que posee su centro reactivo,⁸⁴ como se puede observar en la Figura 3.6.

En la evaluación de la actividad antioxidante mediante DPPH[•], se mide la disminución de la banda de absorción a 517 nm debido a la desactivación de la

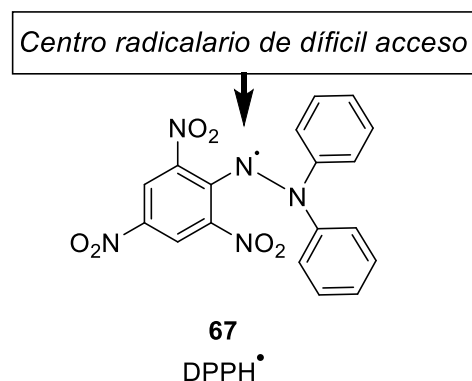


Figura 3.6: estructura química del DPPH[•]

especie radicalaria. En cuanto al mecanismo de esta reacción, en primera instancia se creía que era por transferencia de átomo de hidrógeno (HAT), pero posteriormente, en trabajos cinéticos de Amorati *et al.*¹⁰⁰ se sugirió que el mecanismo es por transferencia de electrones.¹⁰¹ Sin embargo, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que el DPPH• puede reaccionar por ambos mecanismos.¹⁰²

El ensayo por DPPH• es uno de los más simples y económicos; sin embargo, presenta algunas limitaciones en cuanto a sus aplicaciones. Principalmente, porque la reacción entre el antioxidante y la especie radicalaria está influenciada, y en algunos casos regulada, por el impedimento estérico. Es por ello que no es recomendable para estudiar extractos naturales, ya que por lo general son compuestos de elevado peso molecular.⁸⁴

Al igual que en el ensayo con ABTS^{•+}, si el compuesto presenta una actividad antioxidante, se determina el decaimiento de la absorbancia, en este caso a 517 nm. Los resultados de este ensayo se ilustran en la Tabla 3.2. Si bien en este ensayo muchos compuestos no presentaron ninguna actividad antioxidante significativa, los compuestos azufrados presentaron una mayor inhibición del DPPH• que sus contrapartes oxigenada. En este sentido, se puede sugerir que el átomo de azufre puede estar

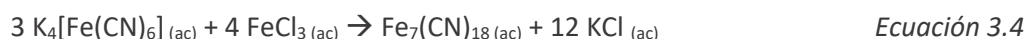
Tabla 3.2: porcentajes de inhibición del DPPH•

Compuestos	100 µM			250 µM			500 µM		
	Media	EEM		Media	EEM		Media	EEM	
12a	0,1	± 0,8		0,4	± 0,2		1,8	± 0,2	
12b	0,3	± 0,1		1,1	± 0,3		1,77	± 0,08	
12c	1,3	± 0,6		3,7	± 0,5		6,3	± 0,5	
12d	0,5	± 0,3		0,2	± 0,1		1,4	± 0,2	
12e	1,7	± 0,3		1,5	± 0,4		3,0	± 0,3	
12f	0,1	± 0,6		0,8	± 0,2		2,4	± 0,3	
13a	7	± 1		15,7	± 0,1		24	± 2	
13b	12,65	± 0,09		26	± 2		38	± 1	
13c	13,6	± 0,1		23,6	± 0,2		38,6	± 0,5	
13d	44	± 3		50,1	± 0,6		56	± 1	
13e	30,4	± 0,7		35,24	± 0,09		39,3	± 0,2	
13g	9	± 1		22,7	± 0,8		34	± 2	
61	37	± 2		54	± 2		72	± 5	
Trolox	52	± 5		64	± 3		85	± 5	

involucrado en la desactivación de las especies radicalarias. El compuesto con mayor inhibición del radical DPPH• resultó ser **61**, lo cual seguramente es debido a que posee un sustituyente fenilo en el N1 del heterociclo, lo cual permite una mayor conjugación del sistema y una disminución en su potencial de oxidación. Asimismo, excluyendo a **61** del análisis, de las demás muestras analizadas, el compuesto **13d** presentó una mayor inhibición de la especie radicalaria. Este último, posee un sustituyente tiofeno, lo cual da mayor sustento a la hipótesis de que los átomos de azufre poseen una gran influencia en la actividad antioxidante.

3.3.1.3 Poder reductor

Algunas sustancias con poder antioxidante son capaces de reducir al ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$), proceso por el cual el Fe(III) se reduce a Fe(II) generando la especie ($K_4[Fe(CN)_6]$), Ecuación 3.3. Esta última, en medio ácido reacciona con el cloruro férrico ($FeCl_3$) para formar un complejo coloreado conocido como **azul de Prusia** ($Fe_7(CN)_{18}$), Ecuación 3.4.⁸³



El azul de Prusia es un conocido pigmento comúnmente empleado en pinturas artísticas,¹⁰³ que además se caracteriza por presentar una intensa banda de absorción a 700 nm. Si un compuesto con poder antioxidante reduce el Fe(III) del ferricianuro de potasio, entonces se observa un incremento en la absorbancia a 700 nm, indicando que la muestra en estudio posee un **poder reductor**.

Según trabajos de Singhal *et al.*,⁸³ los resultados para este tipo de ensayos se pueden informar indicando los valores de absorbancia con sus respectivas desviaciones; y además, a partir del control negativo calcular un porcentaje de incremento del potencial reductor. Dicho control negativo comprende el medio de reacción sin la especie reductora, por lo que se determina la absorbancia corresponde al ferricianuro de potasio. En la Tabla 3.3 se detallan los resultados del aumento de absorbancia, respecto al control negativo, para las moléculas estudiadas mediante este ensayo.

A su vez, también se puede calcular el porcentaje de incremento del poder reductor (% PR) como se indica en la Ecuación 3.5. Los resultados de este último parámetro se detallan conjuntamente en la Tabla 3.3.

$$\% PR = [(A_{mezcla} - A_{CN})/A_{CN}] \times 100 \% \quad \text{Ecuación 3.5}$$

De la Tabla 3.3 se puede observar que el poder reductor aumenta con la concentración de las muestras testeadas, y los incrementos son muy grandes respecto al control negativo. A pesar de que los resultados generalmente se informan cómo se indican en la Tabla 3.3, resulta interesante calcular cómo es el poder reductor respecto al control positivo, es decir, respecto al Trolox. Para ello se definió un nuevo parámetro que denominamos **poder reductor relativo al Trolox** (PRT_x), el cual se calculó a partir de los valores de la Tabla 3.3 como se indica en la Ecuación 3.6, y cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.4.

$$PRT_x = (A_{mezcla}/A_{Trolox}) \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Como se puede apreciar de la Tabla 3.4, particularmente se destaca que para las moléculas **61** y **13d** el poder reductor fue mayor que el control positivo (Trolox). De hecho, para **61**, con dos anillos aromáticos en su estructura, el poder reductor fue cuatro veces mayor al Trolox en la concentración más baja testada. Esto último no se observó en los ensayos con ABTS^{•+} y DPPH[•]. Además, es importante destacar que no se aprecia un aumento del poder reductor con el incremento de la concentración, esto se debe a que en la Tabla 3.4 el valor de referencia es el control positivo. Por otro lado, se puede señalar que la utilización de este parámetro PRT_x permite una mejor visualización de

Tabla 3.3: absorbancia a 700 nm de las muestras medidas en el ensayo del poder reductor y el % PR

Compuestos	100 µM			250 µM			500 µM		
	Media	EEM	% PR	Media	EEM	% PR	Media	EEM	% PR
12a	0,069 ± 0,001		91	0,088 ± 0,001		144	0,126 ± 0,006		249
12b	0,071 ± 0,002		97	0,1122 ± 0,0004		211	0,187 ± 0,008		418
12c	0,101 ± 0,001		180	0,154 ± 0,001		327	0,233 ± 0,002		545
12d	0,089 ± 0,005		147	0,0981 ± 0,0005		172	0,123 ± 0,004		241
12e	0,0727 ± 0,0008		101	0,0806 ± 0,0006		123	0,095 ± 0,002		163
12f	0,064 ± 0,002		77	0,097 ± 0,001		169	0,27 ± 0,05		648
13a	0,1756 ± 0,0009		386	0,35 ± 0,01		870	0,44 ± 0,03		1119
13b	0,223 ± 0,003		518	0,349 ± 0,006		867	0,49 ± 0,02		1257
13c	0,218 ± 0,004		504	0,452 ± 0,004		1152	0,75 ± 0,01		1978
13d	0,642 ± 0,008		1678	1,01 ± 0,03		2698	1,54 ± 0,03		4166
13e	0,272 ± 0,002		653	0,47 ± 0,01		1202	0,780 ± 0,005		2061
13g	0,26 ± 0,01		620	0,469 ± 0,003		1199	0,68 ± 0,04		1784
61	1,36 ± 0,03		3667	2,9 ± 0,1		7933	3,91 ± 0,07		10731
Trolox	0,340 ± 0,007		842	1,35 ± 0,02		3640	2,74 ± 0,06		7490
Control Negativo	0,0361 ± 0,0009		*	0,0361 ± 0,0009		*	0,0361 ± 0,0009		*

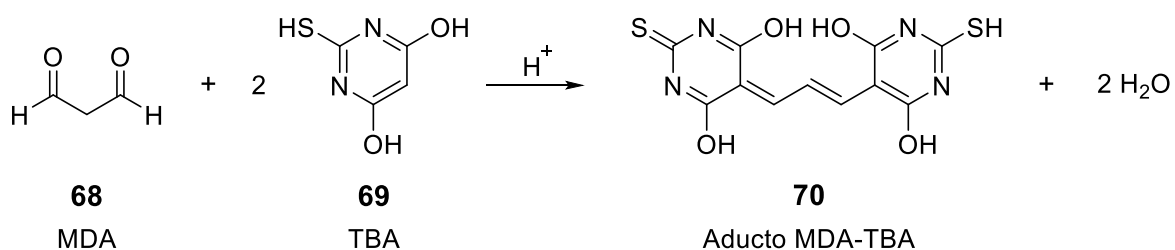
Tabla 3.4: poder reductor relativo al Trolox (PRTx)

Compuestos	100 μ M	250 μ M	500 μ M
12a	0,20	0,07	0,05
12b	0,21	0,08	0,07
12c	0,30	0,11	0,09
12d	0,26	0,07	0,04
12e	0,21	0,06	0,03
12f	0,19	0,07	0,10
13a	0,52	0,26	0,16
13b	0,66	0,26	0,18
13c	0,64	0,33	0,27
13d	1,9	0,75	0,56
13e	0,80	0,35	0,28
13g	0,76	0,35	0,25
61	4,00	2,15	1,43
Trolox	1,00	1,00	1,00

los resultados obtenidos en comparación a lo observado en la Tabla 3.3, donde los resultados se presentan en referencia al control negativo.

3.3.1.4 TBARS

El ensayo de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Species*) fue propuesto en 1993 por Kishida *et al.*,¹⁰⁴ y hasta el día de hoy es uno de los métodos más usados para detectar la oxidación lipídica. Por medio de la oxidación de ácidos grasos insaturados se incrementa la formación de malondialdehído (MDA) **68**. Este marcador de degradación oxidativa **68** reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) **69**, dando lugar a la formación de un pigmento rosa **70**, Esquema 3.2. Este aducto, formado por una molécula de MDA y dos de TBA, posee una banda de absorción entre 532-535 nm.



Esquema 3.2: formación de TBARS

Siguiendo los cambios espectrofotométricos en este intervalo es posible monitorear la inhibición de la oxidación lipídica por parte de un antioxidante.⁸⁵

Para evaluar la capacidad antioxidante de una determinada muestra, se induce la oxidación de un compuesto lipídico. De este modo, el compuesto de interés debe inhibir este proceso oxidativo, reduciendo así la formación de MDA **68**, y consecuentemente, la absorbancia del aducto **70** es menor que el control negativo, por lo tanto, este procedimiento involucra dos pasos esenciales: el sustrato es oxidado mediante la adición de cobre, hierro o alguna fuente de radicales libres, como H₂O₂ o AAPH. Posteriormente, el grado de oxidación se determina mediante la adición de TBA **69** y la medición espectrofotométrica del aducto **70**. De este modo se calcula el nivel porcentual de TBARS según la Ecuación 3.7.

$$\% \text{ nivel de TBARS} = [(A_{CN} - A_{mezcla})/A_{CN}] \times 100 \% \quad \text{Ecuación 3.7}$$

En cuanto a los resultados de los niveles de TBARS presentados en la Tabla 3.5 se puede mencionar que, si bien el control positivo (experimentos con Trolox) permitió validar las mediciones realizadas; los valores de los compuestos **12a**, **12b**, **12d**, **12e**, **13d**, **61** y algunas concentraciones de los compuestos **13c**, **13e** y **13g** no fueron los esperados, a pesar de haber triplicado las mediciones. Esto último se debe a que la absorbancia de la muestra en estudio resultó ser mayor a la del control negativo. Estas desviaciones pueden deberse a que la matriz de análisis es muy compleja, y ante algunas muestras y concentraciones ocurrieron procesos secundarios que no permitieron la cuantificación fehaciente del nivel de TBARS. Los resultados expuestos en la Tabla 3.5, corresponden

Tabla 3.5: % nivel de TBARS

Compuesto	100 µM			250 µM			500 µM		
	Media	EEM		Media	EEM		Media	EEM	
12c	54	± 2		51	± 3		55	± 1	
12f	59	± 3		79	± 5		83,1	± 0,4	
13a	76	± 5		54	± 3		48	± 6	
13b	24,7	± 0,1		80	± 4		51	± 3	
13c	*	± *		24,6	± 0,7		27	± 1	
13e	*	± *		*	± *		25	± 3	
13g	*	± *		*	± *		38,3	± 0,5	
Trolox	15	± 1		30	± 4		60,9	± 0,5	

*Interferencias que no permitieron determinar el %TBARS.

sólo a las determinaciones que fueron coherentes con el control positivo. De la misma se puede destacar que el compuesto **12f** presentó un mayor nivel de TBARS que el control positivo.

3.3.1.5 Inhibición de hemólisis

Los eritrocitos son particularmente sensibles a daños oxidativos debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas y las altas concentraciones de oxígeno celular y hemoglobina. Al exponer a los eritrocitos a radicales libres se producen daños en la membrana celular (peroxidación lipídica), como así también cambios en la morfología celular, entrecruzamiento de proteínas, lo que subsecuentemente conlleva a daños en la membrana y hemólisis.¹⁰⁵

A partir de H₂O₂ o AAPH se puede inducir la oxidación *in vitro* de los eritrocitos, y de este modo es posible estudiar el potencial antioxidante por la inhibición de hemólisis. Además, debido a que el eritrocito es el sustrato oxidable, este método presenta mayor relevancia biológica que otros tipos de ensayos antioxidantes, como el DPPH• o ABTS^{•+}, en los cuales los sustratos son moléculas que no existen *in vivo*.¹⁰⁶

Para calcular el porcentaje de hemólisis se mide la absorbancia de la hemoglobina a 540 nm. Al producirse la lisis de los eritrocitos, aumenta la concentración de hemoglobina en el medio acuoso extracelular. Para calcular el porcentaje de hemólisis se emplea la Ecuación 3.8, donde se usa como referencia el control negativo que corresponde al mayor porcentaje de hemólisis.

$$\% \text{ Hemólisis} = [(A_{CN} - A_{mezcla}) / A_{CN}] \times 100 \% \quad \text{Ecuación 3.8}$$

Como ya se indicó anteriormente, se empleó una pequeña proporción de DMSO para disolver las muestras. En primer lugar, debido a la elevada sensibilidad de este ensayo se corroboró que las proporciones empleadas de DMSO no interfirieran en los resultados de los experimentos. Asimismo, ante la posibilidad que los heterociclos sintetizados indujeran la hemólisis de los eritrocitos, también se estudió la actividad hemolítica de los mismos.

Para este ensayo se analizó un número menor de muestras, enfocándonos principalmente en seis de ellas, tres oxigenadas (**12a-c**) y sus contrapartes azufradas (**13a-c**).

Hemólisis producida por el solvente (DMSO)

En la Tabla 3.6 se puede apreciar que el DMSO induce la hemólisis de los eritrocitos, pues los valores determinados a un 10 y a un 20 % de DMSO son superiores a la hemólisis observada por el

Tabla 3.6: % de hemólisis

Solución (% DMSO)	Media	EEM
4	6 ±	1
10	16 ±	2
20	88 ±	2
PBS	8 ±	2

control positivo (PBS). A partir de estos resultados se decidió trabajar con soluciones a un 10 % de DMSO ya que resulta imprescindible la incorporación de un solvente capaz de disolver las muestras y a su vez obtener concentraciones significativas de las mismas. Cabe aclarar que al disminuir la proporción de DMSO para solubilizar las muestras, se trabajó a concentraciones más bajas de las mismas.

Actividad hemolítica

Como se puede apreciar en la Tabla 3.7, las muestras estudiadas por este ensayo no presentan una actividad hemolítica significativa, pues sus valores son cercanos al observado para el vehículo, es decir, el solvente de las muestras (10 % de DMSO en PBS). De hecho, a mayores concentraciones la actividad hemolítica disminuye, lo cual es un indicio de que en realidad las muestras pueden inhibir la hemólisis de los eritrocitos, y los valores de hemólisis obtenidos pueden deberse al DMSO incorporado en la disolución de las muestras.

Tabla 3.7: % de hemólisis debida a las muestras

Muestra	75 µM			125 µM			250 µM		
	Media	EEM		Media	EEM		Media	EEM	
12a	11,12 ±	0,07		8,1 ±	0,8		4,9 ±	0,3	
12b	8,9 ±	0,3		7,0 ±	0,5		5,1 ±	0,2	
12c	5,0 ±	0,1		3,3 ±	0,6		3,9 ±	0,3	
13a	8 ±	1		4,1 ±	0,3		4,0 ±	0,2	
13b	8,5 ±	0,3		7,1 ±	0,4		5,15 ±	0,05	
13c	10,8 ±	0,3		5,7 ±	0,4		4,3 ±	0,3	
Vehículo	11,4 ±	0,7		11,4 ±	0,7		11,4 ±	0,7	

Inhibición de hemólisis

Una vez determinada la proporción de DMSO con la que es posible realizar el ensayo, y además corroborar que las muestras no poseyeran actividad hemolítica, se procedió a determinar su capacidad como inhibidores de hemólisis.

En este ensayo se realizaron tres controles, un control negativo que implica el 100 % de hemólisis inducida por AAPH, y sobre el cual se realizan los cálculos como se indicaron en la

Ecuación 3.8. Además, un control positivo en el que se empleó Trolox como antioxidante inhibidor de hemólisis. Por último, se realizó un tercer control con el vehículo, es decir, el solvente con que se disolvieron las muestras (10 % de DMSO en PBS) sin el agregado de AAPH. Este último control permitió determinar la hemólisis intrínseca de los eritrocitos debida a la manipulación del ensayo.

En la Tabla 3.8 se detallan los resultados en cuanto a la inhibición de hemólisis. De la misma se puede apreciar que al comparar el vehículo con el control positivo se puede observar que el Trolox presenta una muy buena inhibición de la lisis de los eritrocitos, la cual es similar en los tres niveles de concentración. Además, la oxidación en el vehículo no fue muy alta, indicando que durante el ensayo la oxidación espontánea de los eritrocitos fue menor al 30 %.

De las moléculas analizadas en este ensayo, los compuestos **13a** y **13c** presentaron una gran variación entre los triplicados, por lo que se excluyeron del análisis. De las muestras restantes se puede observar que los porcentajes de inhibición de hemólisis no son muy elevados, y son muy similares en los tres niveles de concentración estudiados. Cabe remarcar que no se deben comparar los porcentajes de inhibición de hemólisis entre las muestras y el vehículo, ya que en este último no se incorporó AAPH para inducir los procesos oxidativos. En este sentido, al comparar los resultados de las muestras con el control positivo se puede apreciar que ninguno de los compuestos presentó un porcentaje de inhibición similar o cercano al Trolox.

Estos bajos porcentajes de inhibición de hemólisis, los cuales oscilan entre un 10-30 %, pueden atribuirse además a las dificultades de solubilizar las muestras en medio acuoso ante la imposibilidad de incorporar mayores proporciones de DMSO. Sin embargo, no hay variaciones significativas entre las diferentes concentraciones testeadas para la misma muestra, lo cual podría indicar que ya se llegó a la mayor inhibición posible con estos compuestos.

Tabla 3.8: % de inhibición de hemólisis

Muestra	75 μ M			125 μ M			250 μ M		
	Media		EEM	Media		EEM	Media		EEM
12a	27	±	2	24	±	0,7	34	±	1
12b	19,2	±	0,2	18	±	1	17,7	±	0,6
12c	15,4	±	0,3	16	±	2	15,3	±	0,5
13b	10	±	6	12	±	5	11,8	±	0,7
Trolox	94,1	±	0,3	96,2	±	0,2	96,7	±	0,3
Vehículo	71	±	5	71	±	5	71	±	5

3.3.2 Toxicidad contra *Artemia Salina*

Las larvas de *Artemia salina* se han usado para evaluar una gran variedad de sustancias tóxicas, como así también de extractos de plantas en la búsqueda de principios biológicamente activos.¹⁰⁷

En primer lugar, se evaluó el efecto que podría tener el DMSO utilizado como co-solvente en el ensayo de toxicidad, por lo que se testearon distintas soluciones de DMSO, cuyas %V/V fueron: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0. De los resultados se observó que a concentraciones de DMSO mayores a 4,5 %V/V se encontraron algunas muertes luego de 24 h de incubación; y no se encontraron larvas vivas a concentraciones mayores de 5,5 %V/V. Por este motivo, las muestras se prepararon a una concentración de 1 mM 4,0 %V/V de DMSO.

Al evaluar la toxicidad de los compuestos sintetizados se calculó el porcentaje de mortalidad según la Ecuación 3.9.

$$\% \text{ Mortality} = \frac{(N_{mm} - N_c)}{N_0} \times 100 \% \quad \text{Ecuación 3.9}$$

Donde N_{mm} es la media de *Artemia salina* muertas, N_0 es el número inicial de larvas y N_c representa la mortalidad del control negativo (sólo el solvente). Los resultados de las muestras evaluadas, junto con el control positivo ($K_2Cr_2O_7$), se detallan en la Tabla 3.9. Indicando el porcentaje de mortalidad para cada uno de los triplicados.

Cabe destacar que durante el ensayo de las muestras **12d**, **13(a-d)** y **13g** se observó turbidez, es por ello que los resultados para estas muestras no son representativos para la concentración testeada, Tabla 3.9. De las demás muestras estudiadas, se puede apreciar que los compuestos **61** y **13e** son los más tóxicos en este ensayo, con valores similares a los del control positivo. Mientras que los compuestos **12b** y **12f** presentan una toxicidad moderada; y por último los compuestos **12a**, **12c** y **12e** presentaron valores de mortalidad menores al 50 %, siendo **12a** el compuesto con menor toxicidad.

Tabla 3.9: % mortalidad de *Artemia salina*

	12a	12b	12c	12d*	12e	12f	13a*	13b*	13c*	13d*	13e	13g*	61	$K_2Cr_2O_7$
	10	50	60	60	30	50	10	0	100	40	80	70	100	100
	30	70	30	70	50	50	20	0	80	40	100	80	100	100
	0	90	50	90	40	60	20	0	90	40	100	70	100	100
Media	13	70	47	73	40	53	17	0	90	40	93	73	100	100
EEM	±9	±12	±9	±9	±6	±3	±3	±0	±5	±0	±7	±3	±0	±0

*Precipitaron en el ensayo.

3.3.3 Ensayos microbiológicos

En los estudios que se detallan a continuación se investigó respecto a la actividad microbiológica de todos los compuestos heterocíclicos sintetizados e indicados en el Figura 3.5. Para ello, se empleó como modelo de laboratorio una bacteria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus*. Esta cepa bacteriana es un agente etiológico muy común en cuanto a enfermedades infecciosas respecta. Además, presenta una fuerte tendencia a adquirir resistencia a antibióticos.¹⁰⁸

Un antibiótico empleado como bactericida contra *S. aureus* es la norfloxaxina **71**, Figura 3.7, una fluoroquinolona de amplio espectro contra la mayoría de las bacterias Gram-positiva y Gram-negativa.¹⁰⁹ Sin embargo, *S. aureus* ha desarrollado resistencia a las fluoroquinolonas por mutaciones en la topoisomeraza IV o la ADN-girasa, lo cual redujo la afinidad del

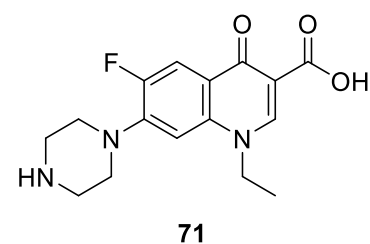


Figura 3.7: norfloxaxina

antibiótico con estas enzimas que son su blanco de acción. Un tercer mecanismo de resistencia que posee la *S. aureus* es por medio de una bomba de eflujo NorA que expulsa del interior celular aquellas sustancias que le resulten tóxicas, disminuyendo así la concentración citoplasmática del antibiótico. Existe una cepa de *S. aureus* que posee una sobreexpresión del gen *norA* que codifica para la bomba de eflujo NorA, conocida como SA1199B. Esta cepa posee una mayor resistencia ante la exposición a fluoroquinolonas, incrementando así la MIC de los antibióticos.¹¹⁰ Esto último ha motivado la investigación en inhibidores de bombas de eflujo (EPI, *Efflux Pump Inhibitor*) que permitan recuperar la eficiencia de los antibióticos.¹¹¹

En este sentido, se realizaron dos ensayos para conocer la MIC de cada compuesto, y seguidamente se evaluó la actividad moduladora en presencia de norfloxaxina. Cabe destacar que en todos los casos se trabajó con la cepa SA1199B descrita anteriormente.

Por otra parte, todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados fueron normalizados por cálculos de los valores promedio geométricos, analizándolos por un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Se consideró estadísticamente significativa $p < 0,05$.

3.3.3.1 Ensayo por Difusión

Este tipo de ensayo, también conocido como *single-disk antibiotic sensitivity test*, es usado por numerosos laboratorios desde 1950 para evaluar en forma rápida y sencilla la susceptibilidad de

microorganismos a diferentes antibióticos.¹¹² El experimento consiste en determinar si una cepa bacteriana es sensible a un agente terapéutico. Para ello se adsorbe el compuesto a evaluar en un círculo de papel estéril, y se coloca sobre el agar de una placa de Petri con un cultivo bacteriano. Se incuba por 24 h a 37 °C y luego se observa si se produce un halo de inhibición alrededor del disco de papel. La aparición de este halo alrededor del disco indica que la bacteria es sensible al compuesto que está adsorbido.

Se testaron todos los compuestos del Figura 3.5, para lo cual se prepararon soluciones de 9000 µg/mL en DMSO y se adsorbieron en discos de papel estéril. Se acomodaron en una placa de Petri con un cultivo de SA1199B. Luego de 24 horas de incubación a 37 °C no se observó ninguna zona de inhibición en las muestras testeadas, ni en el control negativo (DMSO); mientras que, para los controles positivos, en donde el halo de inhibición observado fue: 26 mm para ampicilina, 27 mm para eritromicina y 14 mm para ciprofloxacina.

Una hipótesis sobre los resultados negativos de este ensayo puede ser la baja solubilidad de las muestras en medio acuoso, lo cual impediría la difusión de los compuestos en el agar. De hecho, una de las desventajas de este método radica en que no se puede evaluar la eficiencia de distintos antibióticos a partir del ancho del halo de inhibición debido a que cada compuesto posee una velocidad de difusión diferente.¹¹²

Estudios posteriores realizados por el Dr. Humberto Madeiros Barreto (Universidad Federal de Piauí), un colaborador del Dr. Rivelilson Mendes de Freitas con quien realicé los ensayos microbiológicos, demostraron que los compuestos **13a**, **13c** y **13g** presentan actividad antimicrobiana mediada por la luz contra *S. aureus* ATCC 25923. Estos resultados se obtuvieron realizando un ensayo por difusión, pero con la diferencia de que las placas de Petri fueron irradiadas durante 2 horas con luz UVA (315-400 nm), previo a la incubación de las mismas a 37 °C durante 24 h. Estos resultados vislumbran una posible aplicación de estos compuestos en terapia fotodinámica de enfermedades infecciosas.

3.3.3.2 Ensayo por microtitulación

Mediante este ensayo es posible determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de un agente antimicrobiano.¹¹³ El ensayo consiste en emplear placas de microtitulación en donde en todos

los *spots* se adiciona la misma cantidad de una suspensión bacteriana y la muestra a evaluar se adiciona por microdilución en los diferentes *spots*. Para más detalles ver la Sección Experimental 3.5.3.

Luego de incubar las placas por un día a 37 °C, se adicionó resazurina 0,01 %P/V a cada *spot*, observándose un cambio de color de azul a rosa si hay bacterias vivas.¹¹⁴ De este ensayo colorimétrico se observó que ninguna de las moléculas testeadas inhibió completamente el crecimiento bacteriano a una concentración inicial de 1024 µg/mL, a excepción de los dos compuestos fluorados **12c** y **13c**, que presentaron una baja actividad inhibitoria, cuyas MIC resultaron ser de 512 µg/mL, Figura 3.8.

3.3.3.3 Actividad moduladora

Del ensayo anterior se observó que sólo las moléculas **12c** y **13c** presentaron una interacción positiva con la SA1199B, que posee sobre-expresada la proteína de eflujo norA. Por este motivo, se seleccionan dichos compuestos para estudiar su actividad moduladora con norfloxacin.

En este ensayo, se determinó la MIC de la norfloxacin en presencia y ausencia de los compuestos **12c** y **13c** a concentraciones sub-inhibitorias ($\frac{1}{8}$ MIC = 64 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$). En otras palabras, el medio

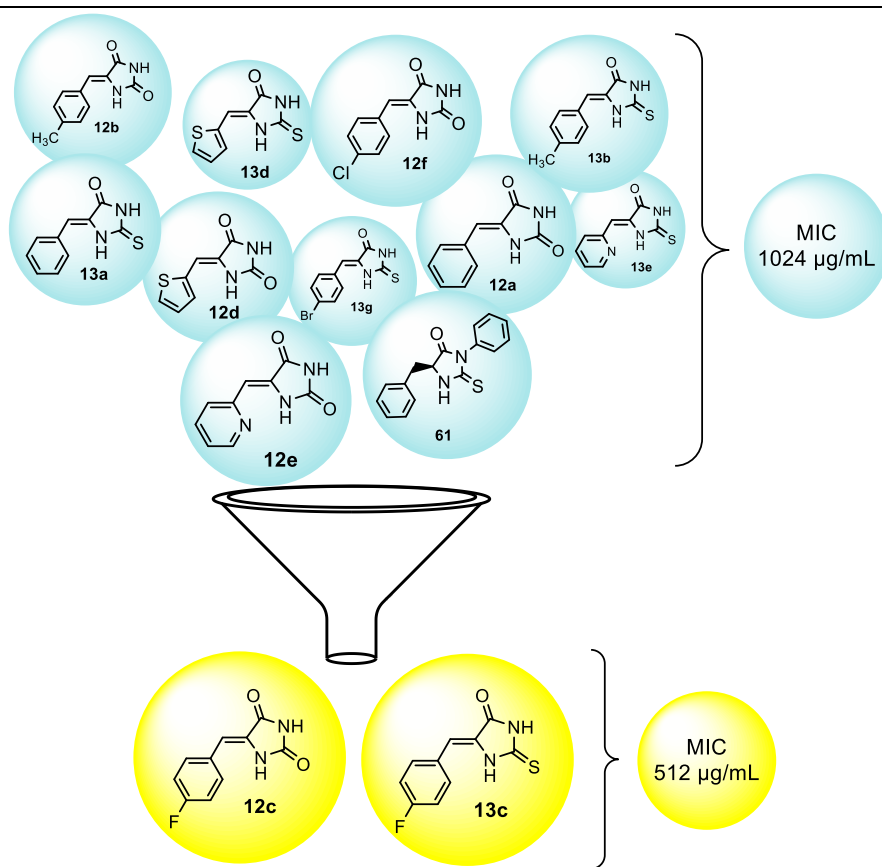


Figura 3.8: MIC de los compuestos testeados por el ensayo colorimétrico de microtitulación. Aquellos con menor MIC se seleccionaron para evaluar su actividad moduladora con norfloxacin.

de cultivo donde se realiza la microdilución del antibiótico posee una concentración 64 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos **12c** y **13c**. Los resultados de este ensayo fueron muy alentadores, pues la MIC de la norfloxacin disminuyó de 156,3 $\mu\text{g/mL}$ a 12,3 $\mu\text{g/mL}$ y 19,5 $\mu\text{g/mL}$ con la incorporación de **12c** y **13c**, respectivamente, es decir, como se indica en la Figura 3.9. Estos resultados sugieren que ambos compuestos podrían ser potenciales inhibidores de bombas de eflujo (EPI).

Por lo general, en este tipo de ensayos con SA1199B, la reducción de MIC ocurre por la intercalación de los compuestos lipofílicos en la membrana plasmática, incrementando así la permeabilidad celular de las moléculas de antibiótico, y/o inhibiendo los sistemas de eflujo; en ambos casos se logra incrementar las concentraciones intracelulares del fármaco.^{108,115}

Por su parte, la capacidad de una sustancia para atravesar membranas biológicas es uno de los aspectos fundamentales relativo a las características de un fármaco. Existen numerosas propiedades fisicoquímicas que definen la permeabilidad de un compuesto. La **lipofilidad** es la de mayor interés debido a la relación directa que presenta con la habilidad para atravesar membranas biológicas por difusión pasiva, como así también, por contribuir en forma entrópica a la unión entre ligando y receptor. La lipofilidad suele expresarse como el **coeficiente de partición (P)** de un compuesto entre

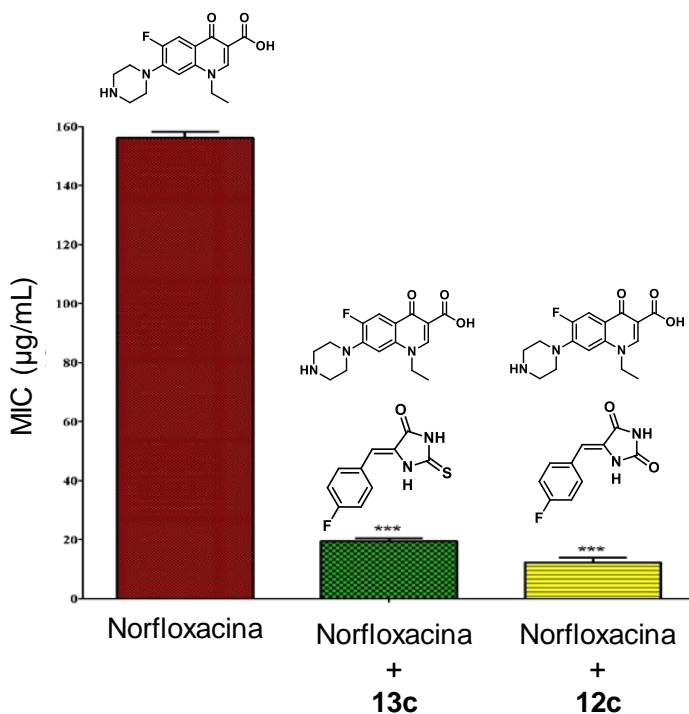


Figura 3.9: MIC de norfloxacin en presencia y ausencia de los compuestos **12c** y **13c**. Cada resultado es la media geométrica de tres experimentos simultáneos. (***) Valores estadísticamente significativos ($p < 0,0001$).

dos fases inmiscibles entre sí, una fase polar (acuosa) y una no polar (orgánica) en equilibrio, cuyo valor es expresado en su forma logarítmica $[\log (P)]$.¹¹⁶

Para dar mayor sustento al mecanismo de la acción moduladora de los compuestos en estudio, se calcularon de manera teórica el valor de $\log (P)$ para **12c** y **13c**, utilizando el programa ACD/Lab Chems sketch V.6.0. De éste cálculo resultó que el compuesto azufrado **13c** es más hidrofóbico que el **12c**, siendo sus $\log(P) = 2,27$ y $1,67$, respectivamente. Sin embargo, estos resultados indican que ambos compuestos poseen una elevada permeabilidad en membranas biológicas si se los compara, por ejemplo, con el Metoprolol (receptor antagonista β).¹¹⁷ Éste es generalmente usado como referencia para estimar la permeabilidad de un gran número de fármacos; esto se debe a que es absorbido en un 95 % en el tracto intestinal, siendo su $\text{Log}(P)=1,72$.^{111,116}

Los valores de partición de las moléculas **12c** y **13c** indican que es muy factible que ambos compuestos puedan intercalarse en la membrana celular, o bien interaccionar con la proteína de eflujo NorA, alterando sus funciones y permitiendo así que la norfloxacin pueda ejercer su acción antibacteriana a menores concentraciones.

Página en blanco

3.4 CONCLUSIONES

De los ensayos realizados se puede establecer, en líneas generales, que los compuestos presentan actividad antioxidante en procesos de transferencia de electrones. Al comparar los resultados de los test de ABTS^{•+}, DPPH[•] y poder reductor, se puede apreciar que por lo general los compuestos azufrados presentan mayor actividad antioxidante que sus contrapartes oxigenadas. De hecho, dentro de la familia de los **13(a-g)**, el compuesto **13d** presentó mayor poder antioxidante en los tres ensayos. Este último compuesto posee como sustituyente un tiofeno; por lo que los resultados indicarían que el átomo de azufre juega un rol preponderante en la capacidad antioxidante de estos compuestos.

Por otra parte, el compuesto **61** que presenta dos sustituyentes fenilo, demostró mayor poder antioxidante que los demás derivados estudiados que poseen un solo sustituyente aromático. Este resultado puede fundamentarse en el hecho de que **61** posee una mayor capacidad para conjugar un radical libre en múltiples estructuras de resonancia, por lo que en el diseño de nuevas moléculas con capacidad antioxidante resultaría interesante considerar estas implicancias estructurales.

Además, se puede enfatizar la necesidad de realizar varios ensayos, con diferentes pruebas químicas para poder estudiar la capacidad antioxidante de un compuesto, ya que los resultados varían de un ensayo a otro. Por ejemplo, al estudiar el poder reductor en la sección 3.3.1.3, para algunos compuestos se observó un poder reductor mayor al control positivo con Trolox, lo cual no se observó en los ensayos de ABTS^{•+} o DPPH[•].

Por otra parte, los ensayos antioxidantes por peroxidación lipídica se realizaron con ciertas dificultades, sin poder tener una proyección sobre todos los compuestos sintetizados; pero a pesar de ello, se puede denotar que los compuestos presentan una leve capacidad antioxidante.

Respecto al ensayo de toxicidad contra *A. Salina*, el más tóxico de los compuestos estudiados resultó ser **61**, que a su vez presentó muy buena actividad antioxidante. También los compuestos **13c** y **13e** presentaron una elevada toxicidad, mientras que el resto de los compuestos presentó una toxicidad moderada.

En relación a los ensayos microbiológicos se observó que los compuestos analizados no presentan una actividad significativa contra la SA1199B. Sólo los compuestos fluorados, **12c** y **13c**

presentaron un MIC de 512 $\mu\text{g/mL}$, por este motivo se decidió estudiar su actividad moduladora con norfloxacina frente a la misma cepa bacteriana. Los resultados de este ensayo fueron muy interesantes ya que trabajando en concentraciones sub-inhedoras de **12c** y **13c** se logró disminuir ocho y doce veces la MIC del antibiótico, respectivamente.

En general, se observó que los compuestos analizados presentan actividades biológicas *in vitro*. Sin embargo, algunos compuestos muestran un elevado poder antioxidante que, en conjunto con los resultados obtenidos respecto a su actividad moduladora los destacó frente a los demás. Debido a esto, se podría sugerir continuar la exploración en sistemas biológicos más complejos con estos candidatos.

3.5 SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.5.1 Ensayos antioxidantes

Las muestras se prepararon en PBS, pero debido a la baja solubilidad de las mismas en medio acuoso fue necesario incorporar pequeñas proporciones de DMSO. Las soluciones madre de las muestras a analizar se prepararon a tres niveles de concentración: 100, 250 y 500 mM al 4, 10 y 20 % de DMSO, respectivamente. Debido a la dilución por el ensayo, las muestras se analizaron con una concentración final de 100, 250, y 500 μM ; con un 0,4; 1 y 2 % de DMSO, respectivamente. Los compuestos **12b**, **12f**, **13a**, **13b** y **13c** resultaron ser insolubles incluso en estas proporciones de DMSO, por lo que se prepararon disolviéndolos inicialmente sólo en DMSO, y luego por la dilución del ensayo se analizaron con una proporción final del 10 % de DMSO.

Además, el control negativo se preparó a las mismas proporciones de DMSO que las muestras, sin la adición de otro componente al medio. Así mismo, para el control positivo se empleó un antioxidante, Trolox **64**, ampliamente reconocido como patrón en este tipo de análisis. Las muestras del control positivo se analizaron a las mismas concentraciones que las muestras en estudio.

3.5.1.1 Radical catiónico ABTS^{•+}

En primer lugar, se mezclaron 950 mL de una solución acuosa de ABTS 7mM con 17 mL de persulfato de potasio 2,45 mM, y se dejó incubando un día en heladera. Posteriormente, a la solución de radical catión ABTS^{•+} se la diluyó con agua purificada para ajustarle su absorbancia a 0,8 en 734 nm.

Para el análisis antioxidante, se incorporaron en tubos de ensayo, por triplicado, 300 μL de las soluciones madre de las muestras y 2,7 mL de solución de ABTS^{•+}. A los tubos se los dejó incubando durante 45 minutos protegidos de la luz. Finalmente se determinó la absorbancia de las muestras a 734 nm, y para los cálculos del porcentaje de inhibición de ABTS^{•+} se comparó con la absorbancia del control negativo como se explicó en la sección 3.3.1.1.

3.5.1.2 Radical DPPH[•]

Se preparó una solución de DPPH[•] de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en etanol y se diluyó hasta ajustar su absorbancia a 0,8 en 517 nm.

Posteriormente, en tubos de ensayo se incorporaron, por triplicado, 300 μL de las soluciones madre de las muestras y 2,7 mL de solución de DPPH \cdot . Se dejó incubando 1 h a temperatura ambiente en ausencia de luz y, por último, se midió la absorbancia de las muestras a 517 nm. Para los cálculos del porcentaje de inhibición de DPPH \cdot se comparó con la absorbancia del control negativo como se indicó en la sección 3.3.1.2.

3.5.1.3 Poder reductor

Para realizar este ensayo se modificó el procedimiento descrito por Oyaizu *et al.*¹¹⁸ En un tubo de ensayo, se incorporaron 300 μL de la muestra a medir, 500 μL de buffer fosfato 0,2 M (pH 6,6) y 500 μL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Se dejó incubando en un baño termostatzado a 50 $^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Posteriormente, una vez que las muestras alcanzaron la temperatura ambiente, se les incorporó 500 μL de ácido tricloro acético, 950 μL de agua destilada y 250 μL de FeCl_3 (0,1 %P/V). Este procedimiento se realizó por triplicado, y finalmente se determinó la absorbancia a 700 nm.

Cabe destacar que la incubación en un baño termostatzado a 50 $^\circ\text{C}$ es importante para permitir que culminen las reacciones de oxidación. Sin embargo, no es conveniente trabajar a mayores temperaturas ya que las mezclas pueden sobre-oxidarse, lo cual produce una desviación entre la linealidad de las mediciones.⁸⁴

3.5.1.4 nivel de TBARS

Para realizar este ensayo se modificó el procedimiento descrito por Guimarães *et al.*¹¹⁹ Como fuente de lípidos se utilizó un homogenato de yema de huevo (1 %P/V) preparado en PBS 50 mM (pH 7,4).

Por triplicado, en tubos de ensayo se incorporó 1 mL del homogenato de yema de huevo (1 %P/V), 300 μL de las muestras, y por su parte, los controles positivo y negativo, para luego incorporar en cada tubo 500 μL de AAPH 200 mM y así inducir la oxidación lipídica. Se dejó incubando en un baño termostatzado a 37 $^\circ\text{C}$ durante 80 minutos. Posteriormente se incorporaron 600 μL de ácido tricloroacético 15 %V/V y 600 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6 %P/V. Para la formación del aducto MDA-TBA, se dejó incubando a 97 $^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 1200 rpm por 3 minutos para finalmente medir la absorbancia del sobrenadante de cada mezcla a 532 nm.

3.5.1.5 Poder de inhibición de hemólisis

Preparación de los eritrocitos

Se trabajó con ratas macho Wistar, a las cuales se las anestesió con centamina (0,2 mL) siguiendo las recomendaciones éticas de la Universidad Federal de Piauí.^f Posteriormente, se recolectó sangre de las mismas mediante una disrupción del plexo retro-orbital del ojo.

Para el ensayo de inhibición de hemólisis se modificó el procedimiento publicado por Jamialahmadi *et al.*¹⁰⁵ Una vez colectada la sangre, se incorporó una gota de anticoagulante y se centrifugaron los tubos a 800 rpm durante 5 minutos para separar el plasma de los eritrocitos. Se descartó el sobrenadante y se enjuagaron los eritrocitos tres veces con PBS; para lo cual se incorporó PBS en una proporción 1:2 V/V (eritrocitos:PBS) y se centrifugó a 200 rpm durante 5 minutos, en cada enjuague. Finalmente, se preparó una suspensión de los eritrocitos al 5 % en PBS, y durante su manipulación se mantuvo a baja temperatura para disminuir la hemólisis espontánea de los mismos.

Hemólisis debida al DMSO

En un tubo de ensayo se incorporaron 300 µL de soluciones en PBS a distintas concentraciones de DMSO (4, 10 y 20 %V/V). El control negativo consistió en un 100 % de hemólisis, por lo que se incorporaron 300 µL de H₂O₂ 200 mM (diluido en PBS); mientras que el control positivo consistió en 300 µL de PBS (pH 7,4).

A continuación, se incorporaron 350 µL de la suspensión de eritrocitos al 5 % en PBS. Se incubaron los tubos en un baño termostatzado a 37 °C durante 50 minutos. Posteriormente, se incorporaron 2,95 mL de PBS (pH 7,4) para luego centrifugar a 1200 rpm durante 3 minutos. Finalmente, se colectó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 540 nm, correspondiente a la absorción de la hemoglobina.

Actividad hemolítica

En un tubo de ensayo, por triplicado, se incorporaron 300 µL de la suspensión de eritrocitos 5 %V/V en PBS. Seguidamente, se incorporaron 300 µL de las muestras y los controles positivo y negativo. Particularmente en este ensayo, las concentraciones de las muestras fueron menores a la

^f Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de la Universidade Federal do Piauí. Res. 023/24.
<https://ufpi.br/etica-em-experimentacao-animal>

de los otros ensayos, ya que no es conveniente usar proporciones de DMSO mayores al 10 %. Por ello, se inició el ensayo con soluciones de las muestras a tres niveles de concentración: 2,5, 1,25 y 0,75 mM. Cabe destacar que fue necesario filtrar las muestras **12a**, **12b**, **13a** y **13b** debido a que presentaron turbidez durante el ensayo.

Al determinar la actividad hemolítica, el control positivo corresponde con un 100 % de hemólisis, para lo cual se usa Tritón X-100. Este detergente se empleó en las mismas concentraciones que las muestras, y con las mismas proporciones de DMSO. Por otra parte, como control negativo se empleó una solución al 10 % de DMSO en PBS.

Posteriormente, se incorporaron 2,4 mL de PBS y se dejó incubando en un baño termostático a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante para medir su absorbancia a 540 nm.

Inhibición de hemólisis

En un tubo de ensayo, por triplicado, se incorporaron 350 µL de la suspensión de eritrocitos al 5 %V/V en PBS y 300 µL de las muestras, los controles positivo y negativo. El control positivo estuvo conformado por soluciones de Trolox a las mismas concentraciones que las muestras a testear, y disueltas con el mismo vehículo (10 % DMSO en PBS). Por otra parte, el control negativo consistió en el vehículo, que ante el agregado de AAPH se produce la hemólisis de los eritrocitos, por lo que este control corresponde al 100 % de hemólisis.

Posteriormente se incorporaron 650 µL de AAPH 200 mM en PBS para inducir la hemólisis de los eritrocitos. Seguidamente, se incubaron los tubos a 37 °C durante 60 minutos. Finalizado este tiempo, se adicionaron 700 µL de PBS y se centrifugó a 2000 rpm por 4 minutos. Por último, se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm.

Además, como un tercer control, en un tubo se incorporó sólo el vehículo sin agregar AAPH, por lo que no se induce la hemólisis, permitiendo determinar la oxidación intrínseca de los eritrocitos, en ausencia de un antioxidante como en el control positivo, o un oxidante como en el control negativo. Este procedimiento también se realizó por triplicado.

3.5.2 Toxicidad contra *Artemia Salina*

Ensayo de toxicidad contra *Artemia Salina*

Se incubaron por 24 h en un vaso de precipitados 150 mg de huevos de *Artemia salina* en 150 mL de una mezcla (1:1) de agua mineral y una solución salina de NaCl 36 g/L. Este proceso se realizó a temperatura ambiente con irradiación continua de luz.

Culminado el tiempo de incubación, se pipetearon diez larvas a un tubo de ensayo con 1 mL de la muestra en estudio. A las 24 horas de estar en contacto con la muestra, se cuentan las *Artemia salina* muertas. Este procedimiento se realizó por triplicado. Las muestras se prepararon a una concentración de 1 mM al 4 %V/V de DMSO en PBS.

Como control positivo se empleó una solución de dicromato de potasio a la misma concentración que las muestras (1 mM).

3.5.3 Ensayos microbiológicos

3.5.3.1 Ensayo por Difusión

Se prepararon soluciones de 9000 $\mu\text{g/mL}$ en DMSO de cada uno de los heterociclos sintetizados y estudiados en este capítulo, Figura 3.5. Posteriormente, se esparcieron 10 μL de cada solución sobre un disco de papel de 6 mm de diámetro, y se depositaron sobre una placa de Petri con un cultivo de SA1199B. Este procedimiento se realizó con técnica aséptica en cercanía de un mechero para evitar la contaminación del cultivo. Como control negativo se sembró en otro papel 10 μL de DMSO, ya que es el solvente de las muestras, mientras que para el control positivo se emplearon discos de papel ya estandarizados con diferentes antibióticos: ciprofloxacina 5 μg , ampicilina 10 μg y eritromicina 15 μg . Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante un día, para finalmente determinar el halo de inhibición midiendo el diámetro del mismo como se indica en la Figura 3.10.

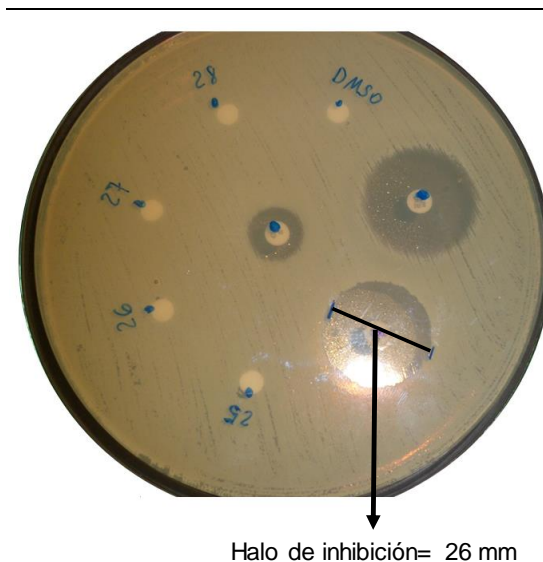


Figura 3.10: placa de Petri empleada para el ensayo por difusión. En el mismo de remarca el halo de inhibición producido por ampicilina.

3.5.3.2 Ensayo por microtitulación

Para preparar el medio bacteriano se incorporaron en un eppendorf 100 μL del inóculo bacteriano de SA1199B 10^8 UFC/mL y 900 μL de BHI (*Brain Heart Infusion*) al 10 %. Este procedimiento se realizó varias veces para completar los volúmenes necesarios para cada ensayo.

Las muestras se prepararon inicialmente a una concentración de 10 mg/mL en DMSO y posteriormente se diluyeron a una concentración final de 1024 $\mu\text{g/mL}$ con agua esterilizada.

En una microplaca de 96 cavidades se adicionaron 100 μL de la suspensión bacteriana preparada previamente. Seguidamente, 100 μL de la muestra 1024 $\mu\text{g/mL}$ se adicionaron a la placa por microdilución, es decir, se incorporó al primer *spot*, se enjuagó el *tip* con el medio, y se colectaron nuevamente 100 μL de ese mismo *spot* para adicionarlo al siguiente. De este modo, la concentración decrece a la mitad de la anterior, y así se sigue subsiguientemente; por lo que las concentraciones en la placa van de 512 a 8 $\mu\text{g/mL}$, como se ilustra en la Figura 3.11 (izq.). El procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

Posteriormente, se sellaron las placas y se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente se incorporó en cada *spot* 20 μL de resazurina 0,01 %P/V, el cual es un indicador empleado para determinar la viabilidad celular. De este modo se puede determinar colorimétricamente las MICs, ya que la resazurina vira del azul al rojo si hubo crecimiento bacteriano.¹²⁰ Como control se dejó una línea de *spots* sin agregar muestra para verificar si las UFC agregadas inicialmente eran viables para realizar el ensayo. En la Figura 3.11 (der.) se ilustran las placas de microtitulación luego de adicionar la resazurina.

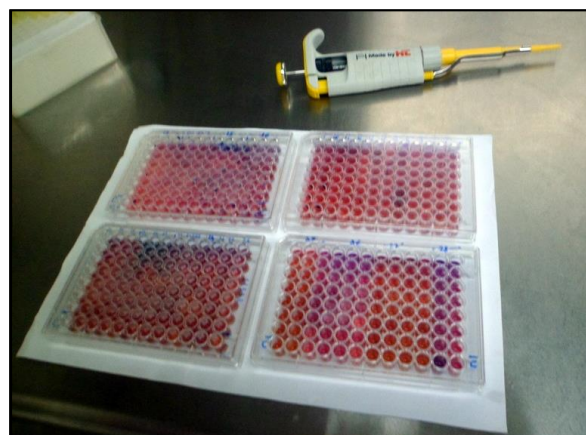
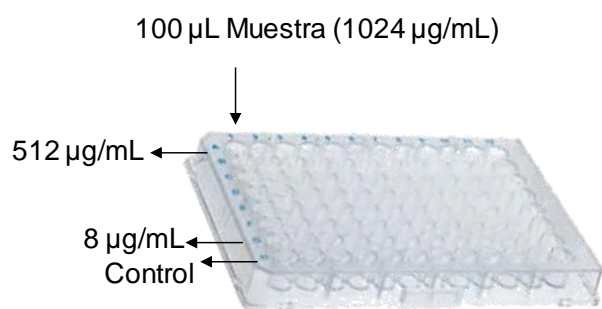


Figura 3.11: placas de microtitulación empleadas para determinar la MICs. (izq.) proceso de microdilución. (der.) placas luego de incorporar la resazurina.

3.5.3.3 Actividad moduladora

Se determinó las MICs de la norfloxacina en sinergia con los compuestos **12c** y **13c**, como moduladores de la resistencia a fluoroquinolonas. Para ello se trabajó en concentraciones subinhibitorias (1/8 MIC) de los compuestos a evaluar.¹²¹

El medio de cultivo se preparó a partir de 150 μL del inóculo bacteriano de SA1199B 10^8 UFC/mL, 94 μL de la muestra 1024 $\mu\text{g/mL}$ y 1256 μL de BHI 10 %. Este procedimiento se realizó para cada muestra: **12c** y **13c**. Por otra parte, para el control (sin muestra agregada) se incorporaron 150 μL del mismo inóculo bacteriano y 1350 μL de BHI 10 %.

Para evaluar la actividad moduladora se incorporaron 100 μL del medio de cultivo con la muestra en cada *spot*. Posteriormente se adicionaron por microdilución 100 μL de norfloxacina 5000 $\mu\text{g/mL}$, por lo que los intervalos de concentración del antibiótico en la placa fueron de 2500 a 2,44 $\mu\text{g/mL}$. En cuanto a las muestras **12c** y **13c**, en cada *spot* la concentración del compuesto es de 64 $\mu\text{g/mL}$. Este procedimiento se realizó por triplicado. Además, en una línea se adicionó el medio de cultivo sin muestra agregada (control negativo). Por otro lado, se realizó un control positivo con norfloxacina en las mismas concentraciones indicadas anteriormente, pero con la diferencia que el medio de cultivo empleado es el mismo que el del control negativo (sin **12c** o **13c**).

Finalmente, se incubaron las placas a 37 °C por 24 h. Transcurrido este tiempo, como en el ensayo anterior, se incorporaron 20 μL de resazurina 0,01 %P/V para determinar en qué concentraciones hubo crecimiento bacteriano. En la Figura 3.12 se ilustra la placa con las muestras empleadas para la actividad moduladora.

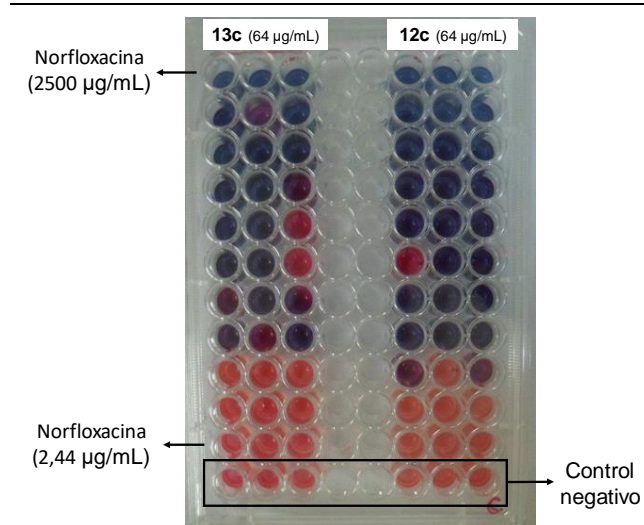


Figura 3.12: placa de microtitulación del ensayo de actividad moduladora con norfloxacina

3.5.4 Análisis estadístico

Los resultados informados como media [\pm error estándar de la media (EEM)] se han obtenido a partir de tres experimentos independientes, y se arribó a dichos valores empleando ANOVA seguido del test de Newman-Keuls por medio del software GraphPad Prism 5.0, considerando $p < 0,05$.

Página en blanco

Capítulo 4

Estudios fotoquímicos de imidazolin e
imidazotiazolonas

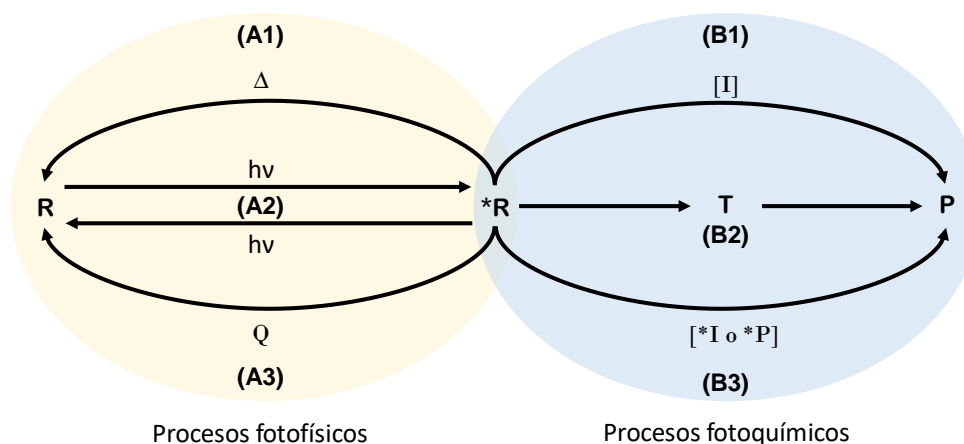
Página en blanco

4.1 INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores se han descrito diferentes reacciones químicas que dieron lugar a la síntesis de nuevos compuestos (Capítulos 1 y 2), como así también a la determinación de alguna actividad biológica a través de un cambio químico (Capítulo 3). En este último capítulo, pero no menos importante, se describen procesos en los cuales está involucrada la luz, en cuyo caso se trata de un proceso fotoquímico o fotofísico. En este tipo de procesos, por lo general, si una molécula (R) absorbe un fotón de determinada energía ($\Delta E = h\nu$), ésta pasa a un estado electrónico excitado de mayor energía (*R), el cual generalmente es de la misma multiplicidad de acuerdo al **principio de Franck-Condon**, pues según la **aproximación de Born-Oppenheimer**, la transición que va a tener lugar luego de la absorción de un fotón va a ser vertical, ya que no hay variación en las coordenadas nucleares.

En la desactivación de un estado excitado (*R) se puede dar lugar a diversos procesos que compiten entre sí. Estos pueden ser **procesos fotofísicos (A)** o **fotoquímicos (B)**; donde la principal diferencia radica en que estos últimos involucran una reacción química que cambia la identidad del sustrato inicial (R).

Como se indica en el Esquema 4.1, la desactivación fotofísica (A) puede ocurrir por varias vías: por calor (A1), por emisión de radiación electromagnética (A2), o por *quenching* al interactuar con otra especie presente en el medio (A3). Por otro lado, si luego de la irradiación se da lugar a la formación de productos, la desactivación es fotoquímica y puede seguir alguno de los siguientes caminos: se forma un intermediario (I) que permite la formación de productos (P) (B1), por efecto



Esquema 4.1: desactivación del estado excitado (*R) por procesos fotofísicos (A) y fotoquímicos (B)

túnel debido a la conversión interna entre superficies de energía potencial (**B2**) o bien, se puede dar lugar a la formación de un intermediario o producto en estado excitado (*I o *P) que se desactiva en la formación de productos (**B3**).

Por lo general, la configuración electrónica en el estado fundamental para una molécula orgánica es singlete (S_0), donde los electrones poseen espines apareados. Luego de la absorción de un fotón, hay una transición a un estado excitado que, debido a restricciones cuánticas, la transición es vertical, es decir, si se absorbe un fotón desde el estado fundamental singlete (S_0), la transición ha de ser a otro estado singlete, por ejemplo, el S_1 , en este caso la transición se indica como: $S_1 \leftarrow S_0$. Al representar estas transiciones en forma esquemática se recurre a los **diagramas de Jablonski**, los cuales resumen de manera gráfica las transiciones radiativas y no radiativas, Figura 4.1.

En estos diagramas podemos identificar distintos procesos fotofísicos, a los cuales se los puede clasificar en radiativos (luminiscentes) y no radiativos, los cuales se listan a continuación. El proceso que tenga lugar luego de la absorción de un fotón dependerá del sistema y la naturaleza química del compuesto en estudio.

Los **procesos no radiativos** incluyen a la relajación vibracional (VR, *vibrational relaxation*) como así también la conversión interna (IC, *internal conversion*) entre estados vibracionales de la misma multiplicidad de espín. También, dentro de esta categoría se puede distinguir al cruce entre sistemas

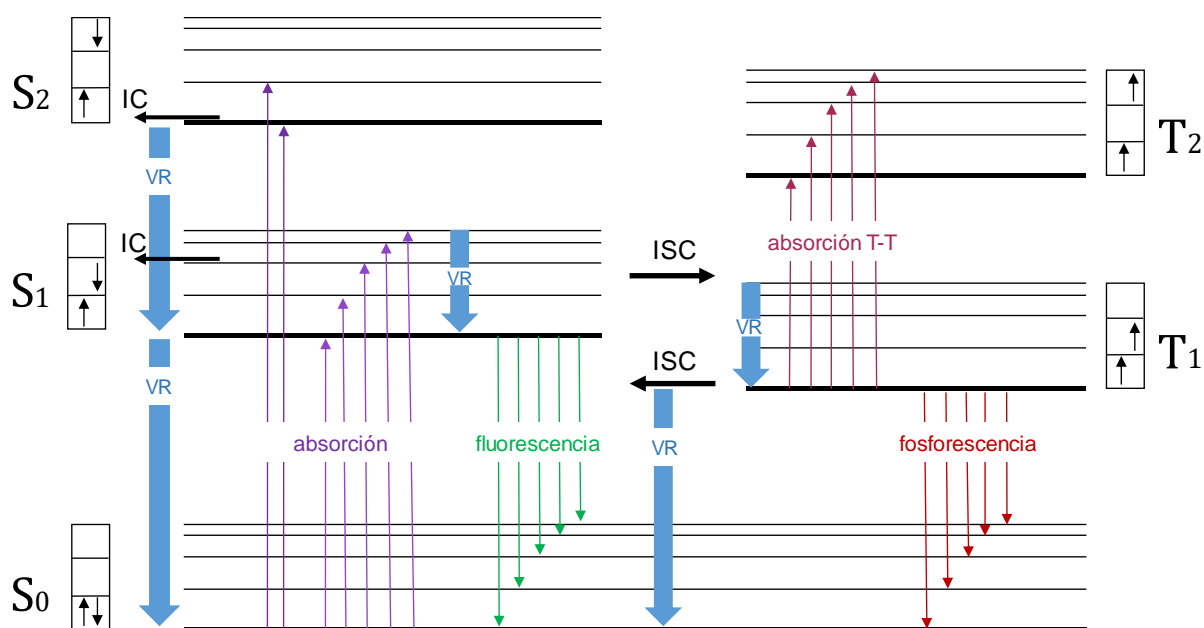


Figura 4.1: diagrama de Jablonski

(ISC, *Intersystem Crossing*), el cual comprende aquellas transiciones intramoleculares prohibidas por espín que ocurren entre estados isoenergéticos o próximos en energía.

Por otra parte, en el diagrama de Jablonski se pueden apreciar dos **procesos radiativos** luego de la absorción, ellos son la fluorescencia y la fosforescencia. El primero tiene lugar entre estados del mismo espín, generalmente desde el estado vibracional más bajo del estado excitado al estado fundamental, $S_0 \leftarrow S_1$. Por su parte, la fosforescencia se observa bajo condiciones en donde pueda ocurrir un cruce entre sistemas. Generalmente, este evento se corresponde con la emisión $S_0 \leftarrow T_1$, el cual compite con el proceso no radiativo de ISC.

Por lo mencionado anteriormente, los procesos radiativos compiten con diferentes mecanismos no radiativos. Sumado a esto, la especie electrónicamente excitada ($*R$) puede desactivarse debido a la presencia de otra molécula o bien, por una colisión con otra especie en el medio. Estos procesos se los distinguen como **quenching** y se aprecian al observar un decaimiento en la emisión luminiscente, lo cual se traduce en una disminución del **rendimiento cuántico**.

Al enfocarse en los procesos fotoquímicos, una molécula que ha absorbido un fotón y se encuentra en un estado excitado puede liberar ese exceso de energía por medio de reacciones químicas. A estas reacciones se las puede clasificar primariamente en uni- o bimoleculares y a su vez, se las puede diferenciar según su acción. En este capítulo se desarrollará un tipo especial de reacción unimolecular mediada por la luz: la **isomerización**. Este evento resulta usual cuando se tienen isómeros Z/E debido a la presencia de una unión de tipo π . Al irradiar un compuesto con estas características, se puede generar un isómero del sustrato de partida o desplazar el equilibrio de un isómero a otro. Cuando un fotón es absorbido por un alqueno, la libre rotación en el enlace π , que estaba impedida en el estado basal, se ve posibilitada en el estado excitado (π^*), y así puede obtenerse el isómero de partida, Figura 4.2.

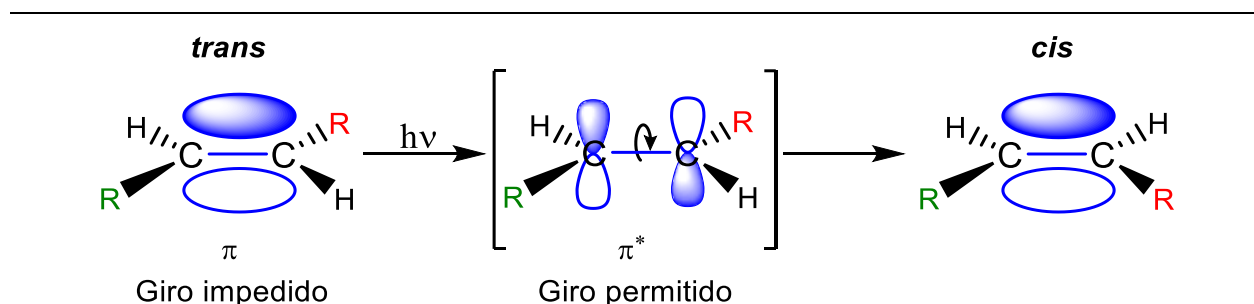
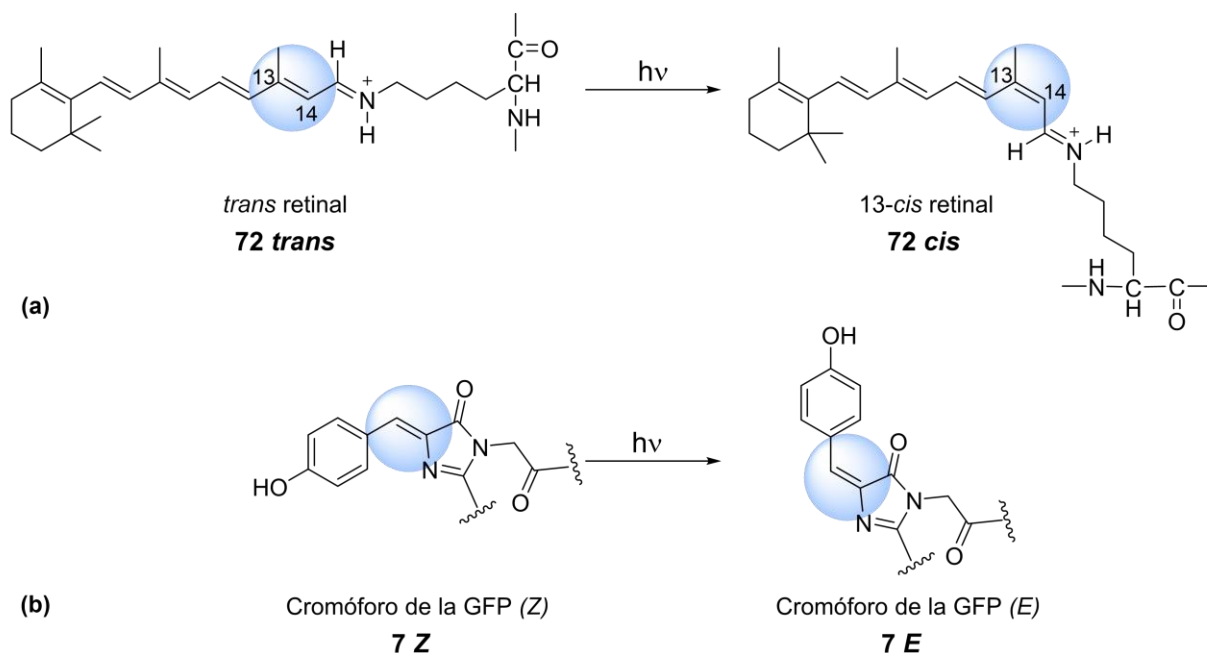


Figura 4.2: fotoisomerización de un enlace π .

El proceso de fotoisomerización tiene lugar en numerosos sistemas biológicos, por ejemplo, el retinol (**72**) es un cromóforo que se encuentra en el interior de la bacteriorodopsina, una proteína de membrana de *Halobacterium halobium*. Al irradiarla con luz visible, el retinol isomeriza de *trans* a *13-cis*, y esto desencadena la translocación de un protón responsable de la síntesis de ATP (adenosina trifosfato), Esquema 4.2(a). Posteriormente, el *13-cis* retinal espontáneamente vuelve al *trans* retinal, y el fotociclo se repite.¹²²

Otro ejemplo, ampliamente estudiado y conocido, es el de la Proteína Fluorescente Verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*). Esta proteína fue identificada por primera vez en 1955 en el estudio de la bioluminiscencia de la medusa *Aequorea victoria*.¹²³ Desde entonces, la GFP es usada como un biomarcador en biología molecular, medicina y biología celular.¹⁸ Esto se debe a que ha permitido visualizar células cancerosas,^{124,125} como así también monitorear la expresión génica.¹²⁶ El cromóforo de la GFP es una *p*-hidroxi benciliden imidazolina **7**, el cual puede fotoisomerizar de la forma *Z* a la *E*, Esquema 4.2 (b). El conformero *Z* es el que se forma naturalmente en la proteína de la GFP, y es capaz de emitir fluorescencia a 508 nm, mientras que el conformero *E* no presenta emisión alguna.^{127,128}

Por otro lado, algunas moléculas presentan un equilibrio entre dos especies isoméricas, $Z \rightleftharpoons E$, y por lo general, la proporción de uno de ellos se ve favorecida respecto al otro debido a su estabilidad



Esquema 4.2: fotoisomerización (a) del retinal y (b) del cromóforo de la GFP

en determinadas condiciones. En el equilibrio termodinámico, las poblaciones de cada isómero van a estar descritas por la **distribución de Boltzmann**, la cual establece que las poblaciones de los estados permanecen constantes en el equilibrio térmico, pero la identidad precisa de cada molécula puede cambiar.

Por lo tanto, ante un equilibrio entre dos isómeros, $Z \rightleftharpoons E$, la transformación de una especie a otra puede estar mediada por la absorción de fotones de una determinada energía. De este modo, es posible desplazar el equilibrio hacia un isómero en particular, modificando así las proporciones descritas según la distribución de Boltzmann en el equilibrio térmico. Además, si ante la continua irradiación de un compuesto, la concentración de los isómeros permanece constante, se ha alcanzado un **equilibrio fotoestacionario**. Al detener la irradiación, ambos isómeros van a volver a las poblaciones naturales en equilibrio térmico. Esta reversión puede ser térmica o por irradiación a una longitud de onda diferente a la de isomerización (*photoreversion*).¹²⁹

En cuanto a la **reversión térmica**, a partir del estudio cinético de la misma es posible determinar diferentes parámetros termodinámicos, los cuales contribuye no sólo a la comprensión de los mecanismos de reacción sino también a la caracterización fisicoquímica del sistema.

Por otra parte, los procesos de fotoisomerización resultan muy atractivos en el desarrollo de **motores moleculares** activados por luz, es decir, en **foto-interruptores** (*photoswitches*). La ventaja de estos diseños moleculares radica en poder pasar de un estado fluorescente a otro no fluorescente, o viceversa, como respuesta ante una irradiación específica. De este modo, los motores moleculares pueden almacenar información a nivel molecular, lo cual le otorga aplicabilidad en diversos campos de la nanotecnología, biomedicina, entre otros.

En general, las isomerizaciones *cis-trans* por medio de un doble enlace son extremadamente limpias, con la ventaja adicional que sus reacciones son reversibles, por lo que estas reacciones se han investigado en numerosos sistemas, tanto biológicos como artificiales.¹³⁰ Por citar un ejemplo, se han desarrollado *photoswitches* basados en ariliden hidantoínas, análogos al cromóforo de imidazolinona de la GFP, donde mediante factores externos se pudo controlar su estado fotoestacionario,¹³¹ es decir, ambos isómeros están en un equilibrio dinámico mediado por la luz, manteniendo sus proporciones constantes.¹³²

Por otra parte, la emisión del cromóforo de la GFP es altamente dependiente su microambiente.¹²⁷ Naturalmente, el cromóforo **7** se encuentra inmovilizado dentro de la proteína en

el interior de un barril- β , y se conoce que dicho cromóforo no presenta emisión de fluorescencia fuera de este microambiente, pues en solución se ven favorecidos aquellos mecanismos de desactivación no radiativos. Por esto último, resulta muy interesante investigar cómo es el comportamiento de este cromóforo, y análogos al mismo, en diferentes entornos moleculares. Recientemente, se han sintetizados derivados al cromóforo de la GFP que no presentan emisión en solución, aunque sí lo hacen en presencia de ADN.^{19,133} Esta última interacción podría ser empleada para la detección de esta biomolécula por técnicas de fluorescencia, como una alternativa al bromuro de etidio, que es uno de los marcadores más empleados por su emisión de fluorescencia al intercalarse con ADN, con la gran desventaja de su elevada toxicidad.¹³⁴ Al mismo tiempo cabe destacar que, los compuestos capaces de interactuar con ADN poseen potencialidad como agentes antitumorales, ya que debido a esta interacción pueden alterar algunas funciones celulares.¹³⁵

Por otra parte, recientemente el grupo de la Dra. Natalia Shustova (Universidad de Carolina del Sur, EEUU) logró inmovilizar análogos sintéticos al cromóforo **7** en MOFs, *Metal Organic Frameworks*, emulando así el barril- β de la GFP, Figura 4.3.^{7-20,21,136} Los MOFs son estructuras cristalinas, autoensambladas, que consisten en ligandos orgánicos conectados a una estructura inorgánica secundaria.¹³⁷ Estos materiales han tenido un gran auge en los últimos tiempos debido a sus potenciales aplicaciones en sensores, fotocatalisis,¹³⁸ como así también en el desarrollo de LEDs (*light-emitting diodes*)¹³⁹ y procesos de transferencia de energía.¹³⁶

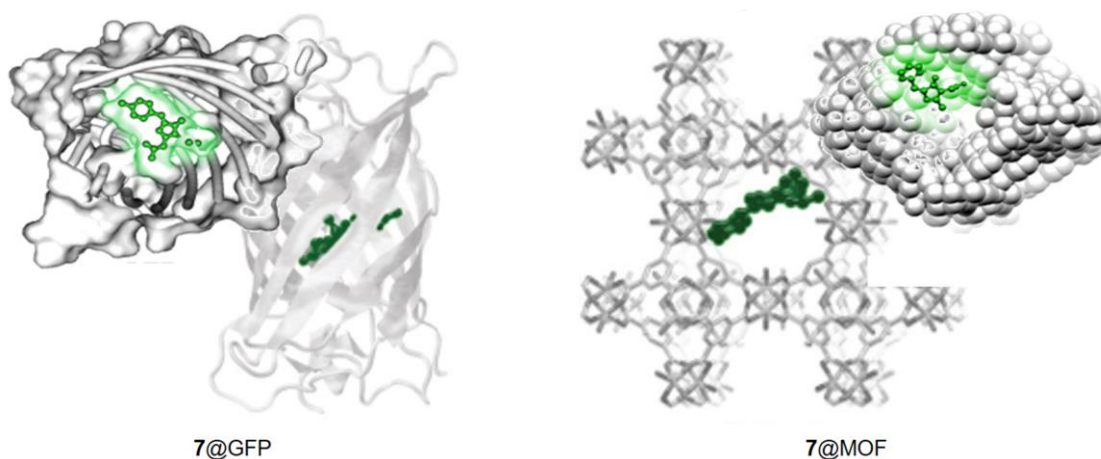


Figura 4.3: representación del cromóforo **7** inmovilizado en el interior del barril- β de la GFP (*izq.*) y en el poro de un MOF (*der.*).^{vii}

⁷ Figura editada de las publicaciones: [20] Dolgoplova *et al.* *Dalton Trans.* **2016**, 45 (24), 9884–9891 y [21] Williams *et al.* *JACS* **2015**, 137 (6), 2223–2226.

En este capítulo se investigó sobre las propiedades fotoquímicas de algunas de las aridilen imidazolininas sintetizadas en el Capítulo 1, las cuales son análogas estructurales al cromóforo **7** de la GFP. En este sentido, se estudió la fotoisomerización $Z \rightarrow E$, para luego hacer determinaciones experimentales en cuanto a la reversión térmica ($E \rightarrow Z$) de estos isómeros. Además, se determinó la emisión de estas moléculas en interacción con ADN doble hebra de esperma de salmón. Finalmente, a través de una estadía en los laboratorios de la Dra. Shustova, por medio de la fundación Fulbrighth, se trabajó en la inclusión de estas moléculas en MOFs, estudiando sus propiedades fotofísicas.

Página en blanco

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En este Capítulo se trabaja específicamente con algunas de las moléculas sintetizadas en el Capítulo 1, con los sustituyentes -H, -CH₃, y -F en el anillo aromático, en tres tipos de moléculas: las oxigenadas, sus contra partes azufradas, y las bicíclicas; las estructuras de las mismas se indican en la Figura 4.4. Para esta serie de compuestos se pretende:

- i. Estudiar la fotoisomerización $Z \rightarrow E$ utilizando irradiación láser.
- ii. Seguir la reversión térmica *in situ* mediante RMN-¹H para obtener parámetros cinéticos y termodinámicos.
- iii. Estudiar la interacción con ADN doble hebra mediante emisión de fluorescencia.
- iv. Introducirlos mediante síntesis solvotérmica en diferentes MOFs y caracterizarlos por PXRD, y emisión de fluorescencia.

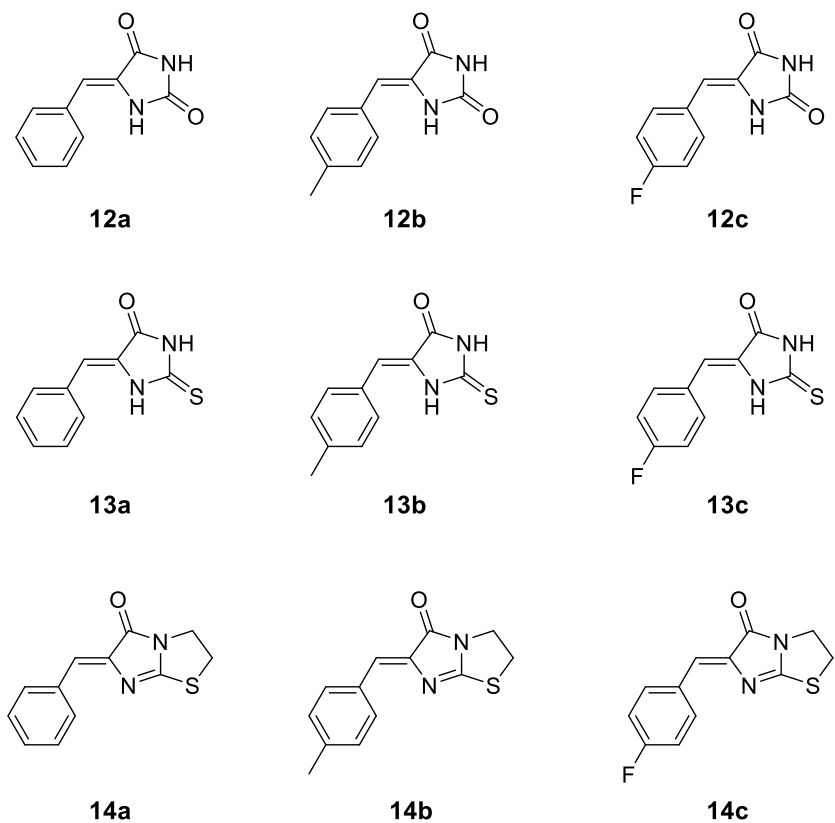


Figura 4.4: ariliden imidazolinas seleccionadas para los estudios fotoquímicos

Página en blanco

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Fotoisomerización láser

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado previamente la fotoisomerización y reversión térmica de **13a**,¹⁴⁰ por lo que en este trabajo de tesis se profundizó sobre los conocimientos ya desarrollados respecto a este sistema, a fin de indagar acerca de los efectos de los sustituyentes en el anillo aromático (**13b,c**); y además, estudiar los biciclos sintetizados a partir de estos últimos (**14a-c**).

Los espectros de absorción de las ariliden-tiohidantoínas (**13a-c**) estudiadas poseen las mismas bandas de absorción, diferenciándose por pocos nanómetros en sus $\lambda_{\text{máx}}$ en ACN. En primera instancia, se estudió para estas tres sustancias la fotoisomerización $Z \rightarrow E$ irradiando con un láser de Nd:YAG a 355 nm. La isomerización fue seguida por espectroscopía UV-vis, ya que a medida que se desplaza el equilibrio hacia el isómero E se pueden apreciar dos puntos isobésticos, lo cual indica la presencia de dos especies en equilibrio.¹⁴¹ Por ejemplo, para la p -metilbenciliden-tiohidantoína, luego de irradiar 40 segundos a 355 nm y a una potencia de 18 mW, se pueden apreciar dos puntos isobésticos a 240 nm y 367 nm, con decrecimiento de las bandas del isómero Z en 249 nm y 358 nm y el consecuente aumento de la absorción del isómero E a 230 nm y 373 nm, Figura 4.5.

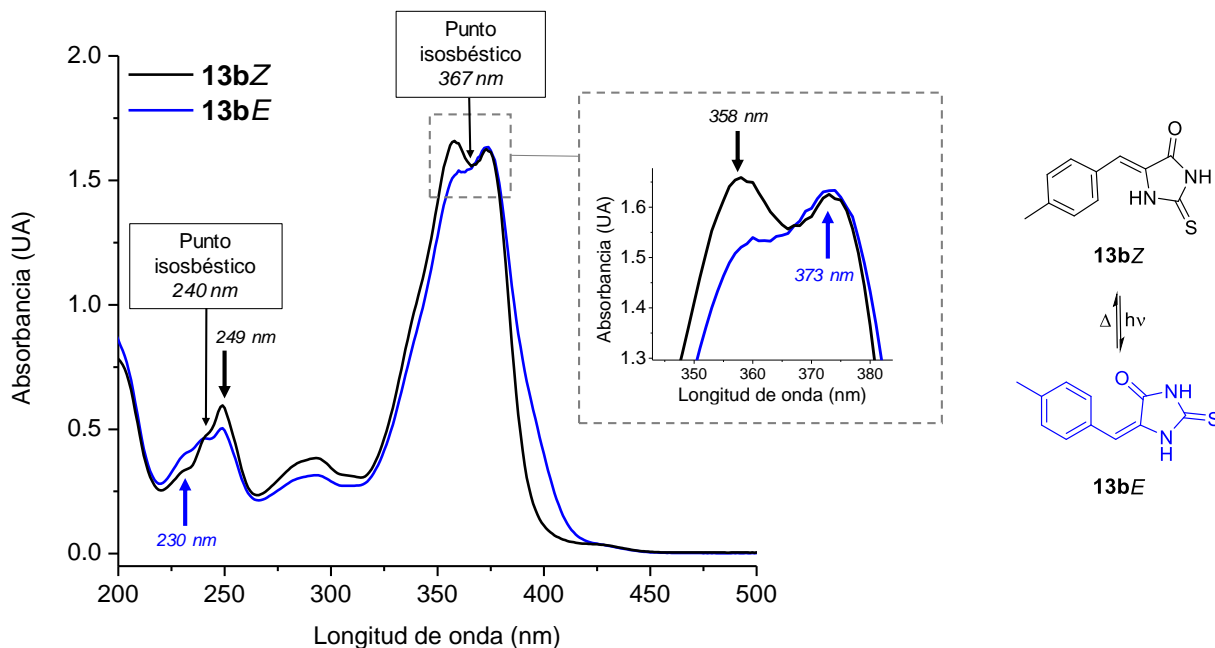


Figura 4.5: espectros de absorción UV-vis de **13bZ** y E en ACN.

Por estudios de Pepino *et al.*,¹⁴⁰ se corroboró que la isomerización $Z \rightarrow E$ es un proceso monofotónico y, además, el mecanismo más favorecido energéticamente es el que transcurre por la rotación del ángulo diedro τ mediante una vía biradicalaria. Continuando con estas investigaciones, se midieron las velocidades de este proceso para los compuestos **13a** y **13c** ambos con la misma potencia láser de 18 mW, para ello se fue monitoreando la absorbancia de la banda correspondiente al isómero Z a distintos tiempos de irradiación. Los resultados se indican en la Figura 4.6, en donde se observa que para el compuesto fluorado **13c** el proceso es de isomerización es un poco más rápido. Esto concuerda con las investigaciones previas de este sistema en cuanto al mecanismo de isomerización, pues si el mismo transcurre por una vía biradicalaria, el átomo de flúor en la posición *para* del anillo aromático puede estabilizar el intermediario por estructuras de resonancia,¹⁴² como se indica de manera general en el Esquema 4.3.

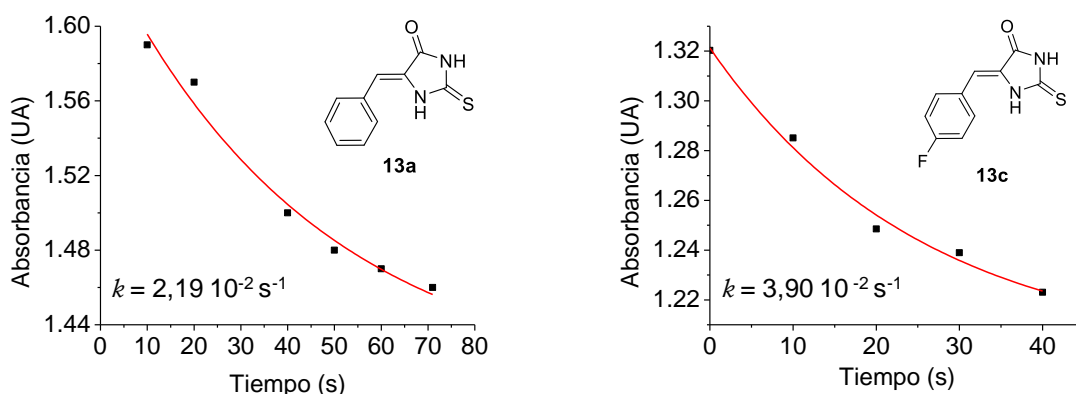
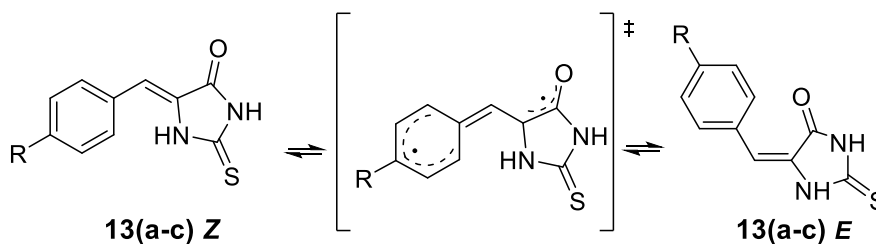


Figura 4.6: absorbancia en el tiempo para la isomerización $Z \rightarrow E$ de **13a** y **13c**



Esquema 4.3: mecanismo de isomerización Z/E biradicalario

Empleando el mismo arreglo experimental, se compararon las velocidades de conversión $Z \rightarrow E$ entre los compuestos **13b** y **14b**. De este modo se pretende elucidar si la funcionalización del heterociclo afecta esta reacción fotoquímica. Cabe destacar que los compuestos **14(a-c)** poseen un perfil de absorción UV-vis diferente al de **13(a-c)**. En la Figura 4.7 se ilustra el espectro de absorción de **14b**, donde se aprecian sus $\lambda_{\text{máx}}$ a 241, 249, 276, 346, 361 y 379 nm, en ACN. Al irradiar con pulsos

láser de Nd:YAG a 355 nm se identifican varios puntos isobéuticos correspondientes a la fotoisomerización $Z \rightarrow E$: 248, 250, 269, 311 y 385 nm, los cuales se indican en la ampliación de la Figura 4.7.

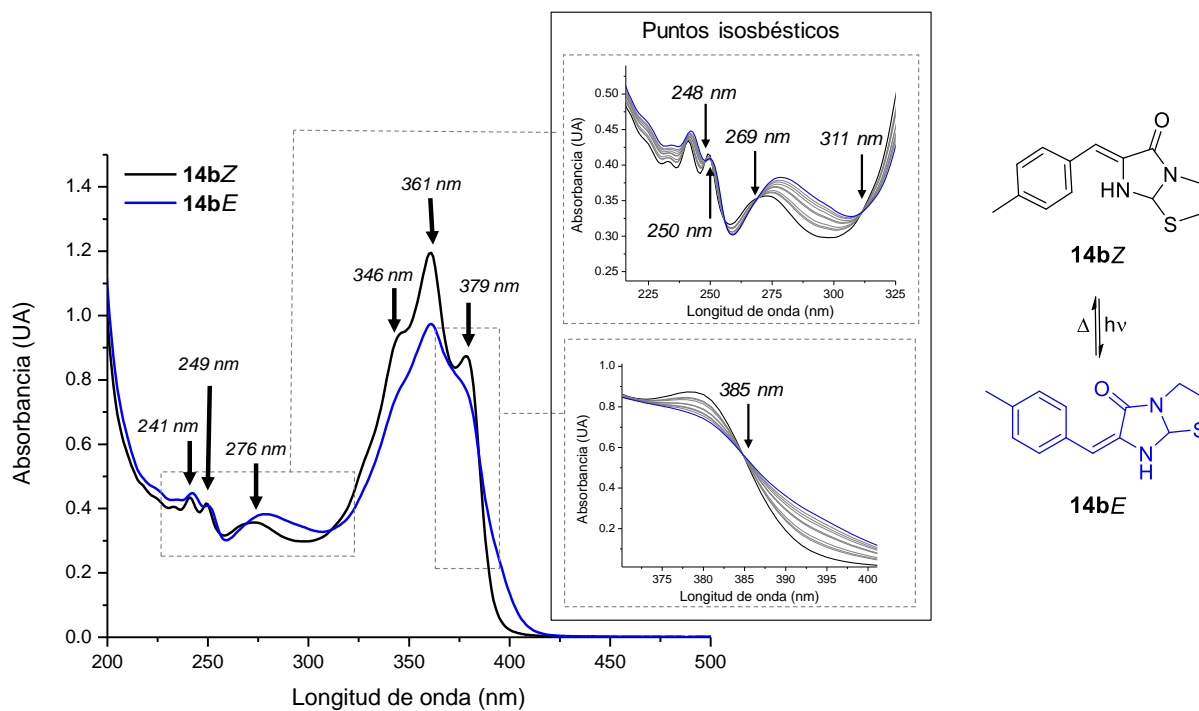


Figura 4.7: espectros de absorción UV-vis de **14b** *Z* y *E* en ACN

Continuando con el análisis, se compararon las velocidades de fotoisomerización de **14b** con su análogo estructural **13b**. Los resultados arrojan que los valores de las constantes de velocidad para **13b** y **14b** son $(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$ y $(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente; lo cual nos permite sugerir que la refuncionalización del heterociclo no cambia sustancialmente sus parámetros cinéticos.

Durante la pasantía en la Universidad de Carolina del Sur se profundizó aún más el estudio de la isomerización de estos compuestos. En esta oportunidad, fue posible monitorear la conversión del isómero *Z* al *E* mediante RMN que, gracias a la diferencia en el corrimiento químico del hidrógeno vinílico de ambos isómeros, permite una cuantificación muy precisa los mismos. En este sentido, en las determinaciones realizadas se evita la necesidad de efectuar deconvoluciones espectrales, como cuando se monitorea este mismo proceso por espectroscopía UV-vis.

Las muestras se disolvieron en CD_3CN y se irradiaron con luz continua a 365 nm en diferentes intervalos de tiempo. A modo ilustrativo, en la Figura 4.8 se puede apreciar para la molécula **14c** un

fragmento del espectro de RMN-¹H antes de irradiarla y luego de 25 minutos de irradiación. De la misma se observa cómo la intensidad del hidrógeno vinílico de **14cE** aumenta con el tiempo de irradiación, mientras la señal correspondiente al **14cZ** disminuye. Este comportamiento se observa para los otros derivados estudiados, **13(a-c)** y **14(a-c)**, y para otras ellas se logró alcanzar el estado fotoestacionario. En la Figura 4.9 se grafica para cada una de estas moléculas la concentración de cada isómero en distintos tiempos de irradiación, y de la misma se puede observar que la concentración de ambas especies no cambia con la continua irradiación de las muestras.

De este modo, se determinaron las poblaciones porcentuales de cada isómero en el equilibrio térmico y en el estado fotoestacionario, las cuales se detallan en la Tabla 4.1. De la misma, se puede apreciar que para los compuestos bicíclicos **14(a-c)** inicialmente no se detecta el isómero *E*. Sin embargo, luego de irradiar las muestras y alcanzar el estado fotoestacionario, la población del isómero *E* es mayor que la del *Z* para los compuestos **14(a-c)**, a diferencia de sus análogos **13(a-c)**, lo cual también se aprecia claramente en la Figura 4.9.

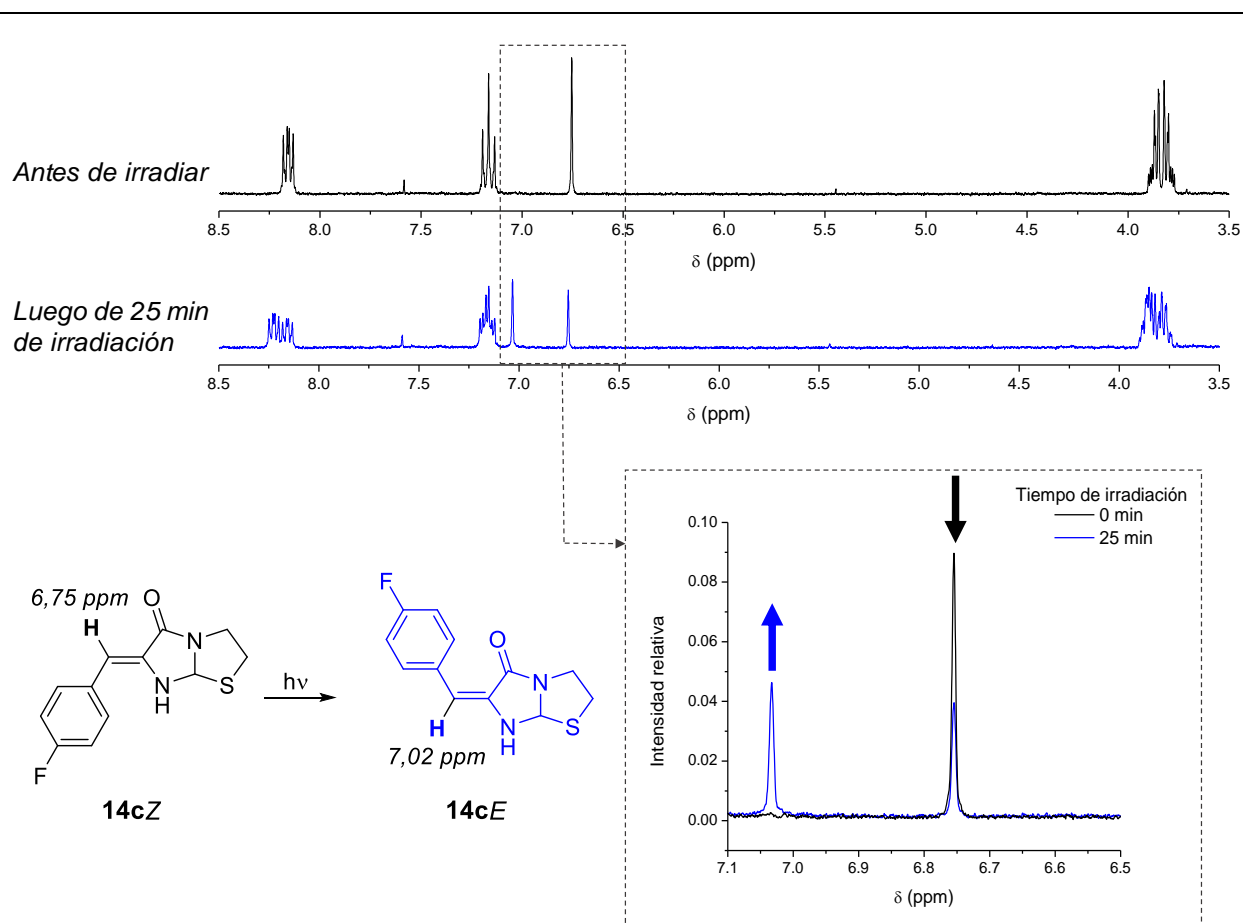


Figura 4.8: fragmento del espectro de RMN-¹H de **14c** a distintos tiempos de irradiación

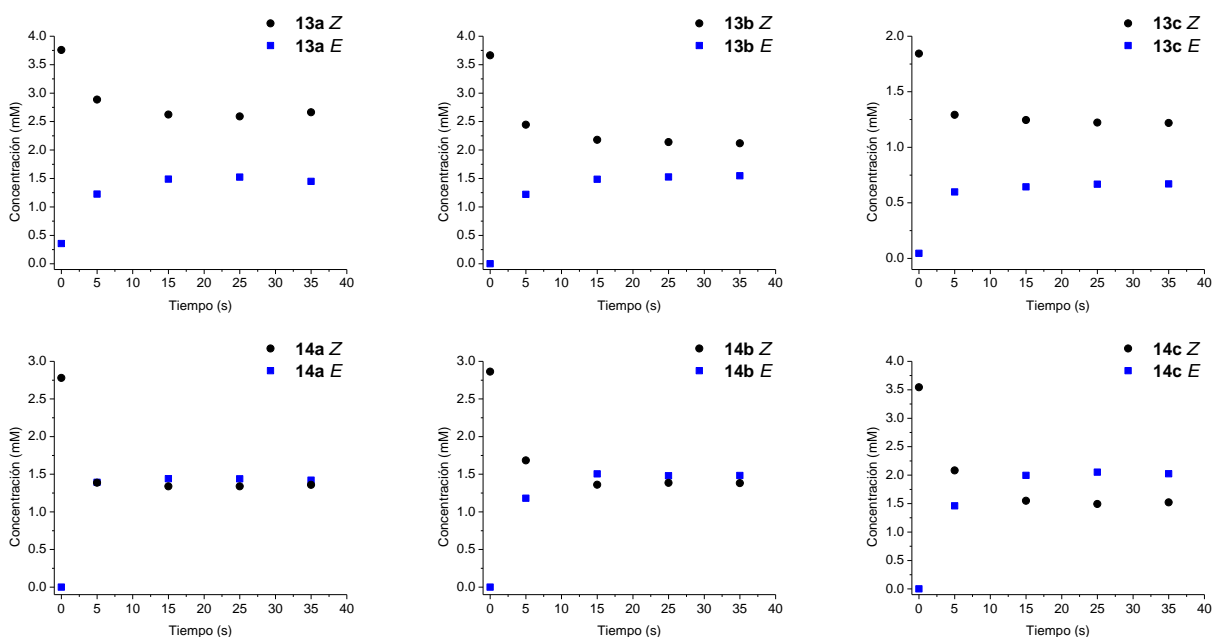


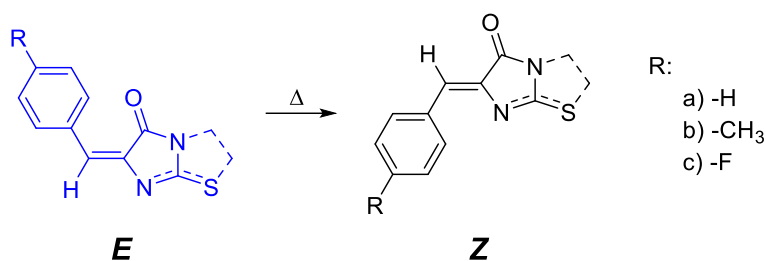
Figura 4.9: fotoisomerización $Z \rightarrow E$ por irradiación a 365 nm, para **13(a-c)** y **14(a-c)**

Tabla 4.1: poblaciones de los isómeros Z y E en el equilibrio térmico y en el estado fotoestacionario

Compuesto	Equilibrio térmico		Estado fotoestacionario	
	Z (%)	E (%)	Z (%)	E (%)
13a	91	9	65	35
13b	100	0	58	42
13c	98	2	65	35
14a	100	0	49	51
14b	100	0	48	52
14c	100	0	43	57

4.3.2 Reversión térmica

Una vez que se llega al equilibrio fotoestacionario, en donde se tiene la mayor proporción posible del isómero E , se procede a estudiar su reversión a la conformación Z , Esquema 4.4. Este proceso resultó ser sumamente lento, requiriendo días a semanas para poder realizar las determinaciones a una dada temperatura. Por este motivo, la realización del experimento fue dificultosa ya que demandó mucho tiempo y un gran número de adquisiciones para poder cuantificar mediante RMN los cambios en las proporciones de ambos isómeros. Primeramente, se intentó realizar las medidas empleando $\text{DMSO}-d_6$ como solvente ya que permite trabajar a mayores concentraciones



Esquema 4.4: reversión térmica $E \rightarrow Z$ para **13(a-c)** y **14(a-c)**

y temperaturas, pero debido a la viscosidad del mismo, la reversión resultaba aún más lenta que en CD₃CN. Por otra parte, se intentó catalizar la reversión mediante el agregado de ácido acético, como así también por irradiación a 590 nm (*photoreversion*), pero no se observaron cambios significativos.

A partir del seguimiento de la reversión térmica se pueden realizar algunas determinaciones de los parámetros cinéticos de este proceso. En este sentido, cabe destacar que al ser un proceso unimolecular, la ecuación de velocidad probablemente es de primer orden como en la mayoría de los casos, Ecuación 4.1. Siguiendo esta hipótesis, se graficaron las concentraciones de uno de los isómeros en función del tiempo, y a partir de un ajuste exponencial se obtuvo la constante de velocidad k para cada compuesto a diferentes temperaturas. De este modo, los parámetros de Arrhenius se calcularon con la Ecuación 4.2 graficando el $\ln(k)$ vs $1/T$. En la Figura 4.10 se grafica la ecuación de Arrhenius a partir de los datos adquiridos experimentalmente.

$$[E] = [E]_0 e^{-k t} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

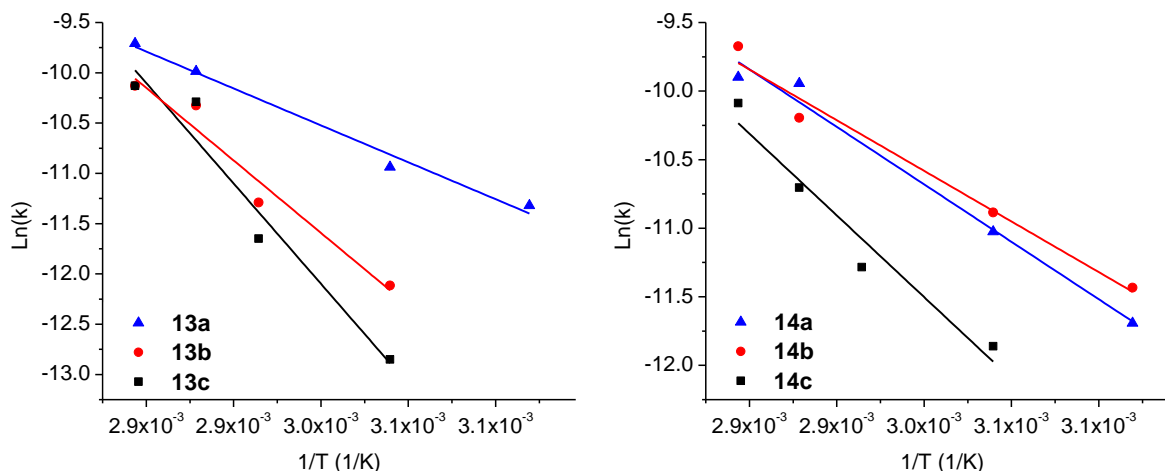


Figura 4.10: gráficos de Arrhenius para la reversión térmica de los compuestos **13(a-c)** y **14(a-c)**

A partir de la pendiente de las gráficas anteriores es posible determinar la energía de activación (E_a), y, además, con el factor A el valor de la entropía de activación (ΔS^\ddagger), como se indica en la Ecuación 4.3.

$$\Delta S^\ddagger = 4,575 \log A - 60,63 \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Posteriormente, considerando una temperatura de 343,15 K (70 °C), la cual es una de las temperaturas en que se realizaron las adquisiciones experimentales, se calcularon otros parámetros de activación. En primer lugar, la entalpía del proceso (ΔH^\ddagger), y seguidamente, la energía libre de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger), Ecuaciones 4.4 y 4.5.

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad \text{Ecuación 4.4}$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad \text{Ecuación 4.5}$$

Todos los resultados de estas mediciones cinéticas se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: parámetros cinéticos para la reversión térmica de los compuestos **13(a-c)** y **14(a-c)**

Compuesto	k (10^{-5} s^{-1})	E_a (kcal/mol)	ΔS^\ddagger (cal/K mol)	ΔH^\ddagger (kcal/mol)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)
13a	4,61	12,16	-44,98	11,47	26,9
13b	3,28	23,88	-11,93	23,20	27,3
13c	3,40	33,06	14,59	32,37	27,4
14a	4,80	13,88	-40,12	13,20	27,0
14b	3,74	12,23	-44,86	11,55	26,9
14c	2,25	19,73	-24,19	19,05	27,4

De la Tabla 4.2 se puede observar que la constante de velocidad de la reversión térmica es mayor para las moléculas sin sustituyente (**13a** y **14a**).

Por otro parte, a excepción de **13c**, los valores de ΔS^\ddagger son negativos, lo cual indica que la estructura del estado de transición es más ordenada que la del punto de partida, es decir, el isómero *E*. Con el fin de comprender esta diferencia, en el grupo de investigación se realizaron cálculos teóricos respecto a las densidades electrónicas de las moléculas desde la configuración *E* de las mismas. Para esto último, se utilizó el programa Gaussian 09 con el método y el conjunto de bases B3LYP 6-311G(d,p). En la Figura 4.11 se ilustran las densidades electrónicas de los compuestos estudiados, y en un simple análisis se puede apreciar que el compuesto **13cE** presenta diferencias en

cuanto a sus análogos con sustituyentes hidrógeno **13aE** y metilo **13bE**. Por este motivo, se indagó aún más sobre los cálculos teóricos para determinar algunos valores que permitan explicar estas diferencias.

En la Tabla 4.3 se resumen a modo comparativo las **cargas de Mulliken** para cada uno de los átomos de carbono del doble enlace, como así también su distancia. En primera instancia, se puede denotar que la carga total sobre el enlace C=C de **13cE** es mayor que en los otros compuestos. Esto influye en que la longitud del enlace sea más pequeña, lo cual condice con el elevado valor de ΔH^\ddagger de isomerización respecto a los otros compuestos (32,37 kcal/mol), Tabla 4.2.

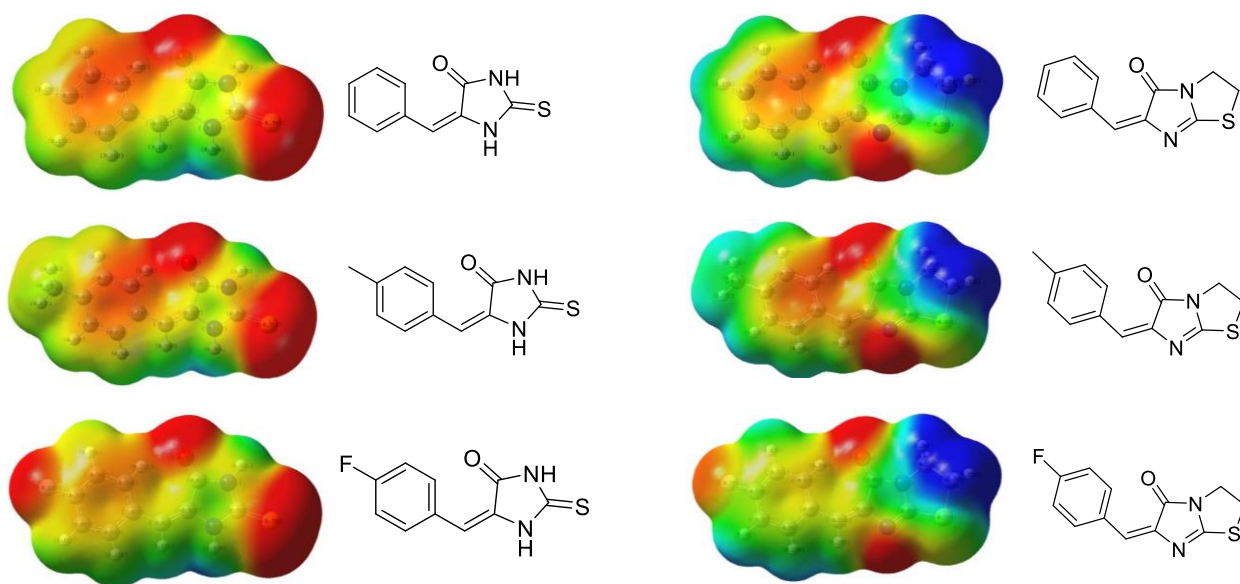


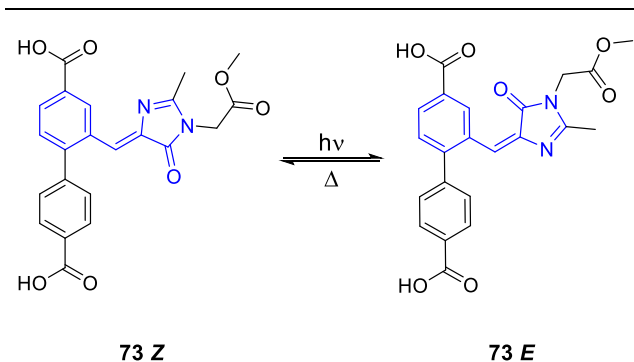
Figura 4.11: distribución de densidades electrónicas de los compuestos **13(a-c)E** y **14(a-c)E**

Tabla 4.3: parámetros teóricos de los isómeros *E* de **13(a-c)** y **14(a-c)**.

Compuesto	*Carga C-6	*Carga C-5	*Carga total sobre el enlace C=C	Longitud enlace C=C (Å)
13a	-0,432	-0,294	-0,726	1,3568
13b	-0,491	-0,237	-0,728	1,3579
13c	-0,424	-0,328	-0,752	1,3567
14a	-0,255	+0,131	-0,124	1,3599
14b	-0,299	+0,227	-0,072	1,3611
14c	-0,143	+0,285	+0,142	1,3598

*Cargas de Mulliken

Por otro lado, las energías libres de activación obtenidas experimentalmente para este trabajo, son similares a las informadas para otras benziliden imidazolininas. Por ejemplo, el ácido dicarboxílico **73**, que incluye la estructura del cromóforo de la GFP, posee una energía libre de activación de 28,5 kcal/mol en DMSO- d_6 ; Esquema 4.5.^{140,143}



Esquema 4.5: fotoisomerización y reversión térmica de **73**. En azul se destaca la benziliden imidazolinina.

Además, estos valores de ΔG^\ddagger son aproximadamente los mismos para todas las moléculas, a pesar de las diferencias en los datos entrópicos y entálpicos, como así también las diferencias en las constantes de velocidad a una misma temperatura. Esta similitud en los valores de energía libre indica que el mecanismo de la isomerización es el mismo para todas las moléculas estudiadas, independientemente del sustituyente arilo y de la funcionalización del heterociclo.

4.3.3 Interacción de los 1,3-heterociclos con ADN doble hebra

En muchos campos de la química, bioquímica y biología molecular se usan sondas para la detección de ADN, ARN y enzimas.¹⁴⁴ Resulta fáctico que pequeñas moléculas orgánicas son una herramienta invaluable para la investigación de sistemas biológicos.¹⁴⁵ Por ejemplo, las técnicas de tinción emplean sondas fluorescentes, las cuales poseen muy bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia en solución, pero su emisión aumenta significativamente al interactuar con una biomolécula que impide la desactivación del estado excitado por procesos no radiativos.

Por otro lado, muchos fármacos empleados como antibióticos o anticancerígenos, interactúan con el ADN para ejercer su acción biológica.¹⁴⁶ Por este motivo, se dispone de diversos estudios respecto a la interacción de ligandos con ADN con objetivos tanto terapéuticos¹⁴⁷ como científicos.¹⁴⁸ En este sentido, distintos fluoróforos pueden asociarse a ácidos nucleicos por medio de interacciones π , puente hidrógeno, interacciones tipo Van der Waals como así también por anclajes covalentes.^{133,149}

Por lo mencionado anteriormente, en esta sección se estudió la luminiscencia de las tioimidazolininas y tioimidazolonas que se presentan en la Figura 4.4 al interactuar con ADN doble hebra de esperma de salmón, comúnmente utilizado en este tipo de ensayos debido a la fácil

obtención y elevada pureza. En este sentido, se examinó la emisión de fluorescencia de estos compuestos en presencia y ausencia de ADN.

En el ensayo se prepararon soluciones de los compuestos en DMSO, y se diluyeron en un *buffer* TE (Tris-EDTA), llegando a una concentración final de 300 μM . Como control positivo, y a modo comparativo, se empleó bromuro de etidio (BrEt), a una concentración de 15 μM debido a su elevada emisión de fluorescencia. Todos los análisis y los tiempos de incubación se realizaron termostatazando el sistema a 30 $^{\circ}\text{C}$. Resulta necesario remarcar que es muy importante controlar las condiciones experimentales para tener una buena reproducibilidad en las adquisiciones.

En la Figura 4.12 se ilustran los resultados de la emisión para los compuestos **13(a y c)** y sus contrapartes fusionadas **14(a y c)**. Como se puede apreciar, estos compuestos no poseen una elevada emisión de fluorescencia en solución. Sin embargo, la misma se incrementó luego de 4 h de incubación en presencia de ADN. Al comparar los compuestos **13a** y **14a** en la Figura 4.12(a), se puede observar que la emisión de fluorescencia se incrementa aproximadamente cuatro veces más para el biciclo fusionado **14a** en contraste con **13a**. Esto último puede deberse a que el compuesto **14a**, como ya se indicó en el Capítulo 1, es más plano, y la planaridad de las moléculas es un factor que contribuye a la interacción con ADN.¹³³ Al analizar los espectros de emisión de los compuestos **13c** y **14c** presentados en la Figura 4.12(b), se observa que no hay incremento en la fluorescencia en presencia de ADN. De este modo, se puede concluir que estos compuestos fluorados no interaccionan significativamente con ADN doble hebra de esperma de salmón. Además, cabe mencionar que la

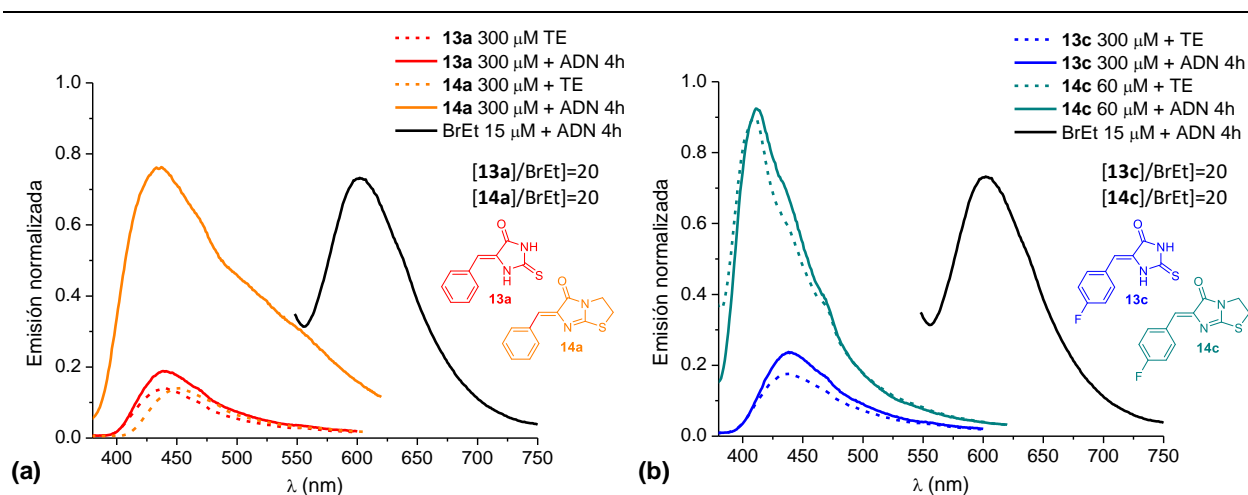
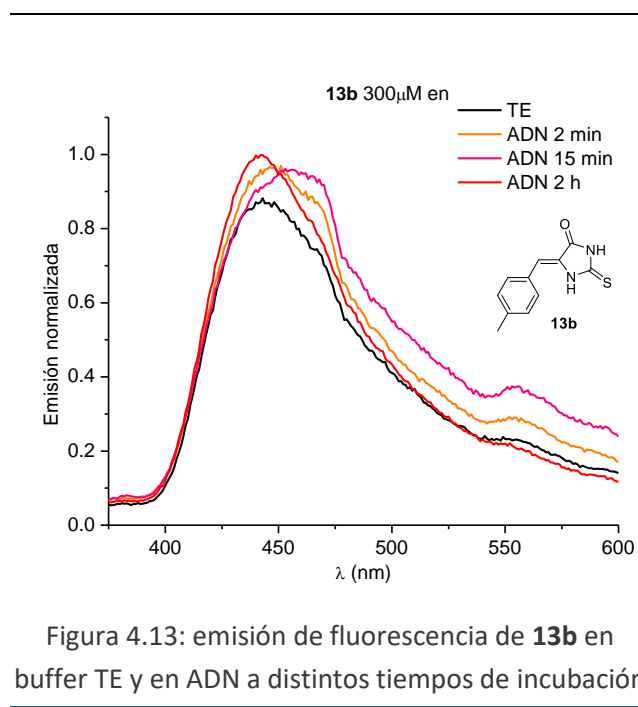


Figura 4.12: espectros de emisión de fluorescencia (a) para los compuestos **13a** y **14a** y (b) para los compuestos **13c** y **14c**; ambos en presencia y ausencia de ADN doble hebra.

fluorescencia del compuesto **14c** es considerablemente mayor respecto a **13c**, por lo que el átomo de flúor en la estructura bicíclica **14c** permite alcanzar una mayor desactivación por este camino radiativo.

Resulta importante remarcar que la concentración del BrEt es veinte veces mayor respecto a las soluciones de los compuestos sintetizados. Por su parte, el compuesto **14a** tendría una potencial aplicabilidad como sonda fluorescente ya que su emisión aparece en la región visible, y además resulta menos tóxico que el BrEt.

Por otra parte, al estudiar la interacción del compuesto **13b** con ADN a diferentes tiempos de incubación, Figura 4.13, se pudo observar que a 15 minutos de incubación el máximo de emisión experimenta un desplazamiento batocrómico. Esto sería un indicio de que la interacción de este tipo de compuestos con ADN no es específica como como en el caso del BrEt, el cual se intercala específicamente entre un par de bases de adenina-timina.¹³⁴



4.3.4 Síntesis y caracterización de los 1,3-heterociclos dentro de MOFs

Recientemente, el grupo de investigación de Dra. Shustova demostró que la inmovilización de cromóforos basados en benciliden imidazolininas dentro de estructuras rígidas tales como MOFs, puede conducir a cambios significativos de la dinámica del cromóforo, aumentando la respuesta fotofísica de los mismos.²¹ Además, los sistemas híbridos donde se incorpora un cromóforo dentro de diferentes MOFs, permiten la modulación del entorno de esta molécula orgánica, pudiendo ir más lejos en el estudio de sus propiedades. Sus investigaciones demostraron que se puede modular la fotoluminiscencia en un amplio intervalo de longitudes de onda, desde 440 nm a 650 nm, por inmovilización no-coordinada de los cromóforos basados en benciliden imidazolininas dentro de la matriz rígida del MOF.²⁰

Básicamente, para sintetizar un MOF se requieren dos componentes fundamentales, una sal inorgánica, que aporte el metal, y un ligando orgánico. Estos en el medio adecuado, reaccionan para

formar una estructura porosa autoensamblada con propiedades cristalinas. Ahora bien, el objetivo de este trabajo es incluir las moléculas sintetizadas previamente: **12(a-c)**, **13(a-c)** y **14(a-c)**, dentro de los poros de dichas estructuras

Principalmente, se pueden distinguir tres alternativas para incorporar una estructura de interés dentro de la cavidad de un MOF. Una de ellas es la **inmovilización coordinativa**, en donde el cromóforo se encuentra en la cavidad del MOF unido covalentemente a su estructura. Para lograr esta inclusión resulta necesario modificar el ligando, incorporándole la molécula de interés, antes del autoensamblaje del MOF. Este método no resulta viable para la inclusión de los compuestos de la Figura 4.4 debido a que se requieren muchos cambios estructurales previos a la unión con un ligando, los cuales nos alejan de las estructuras de interés de este trabajo de tesis.

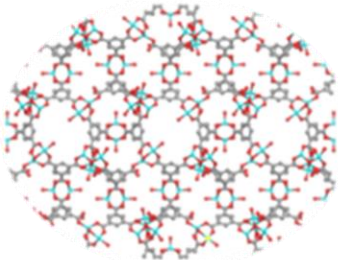
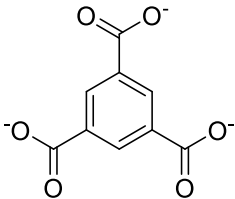
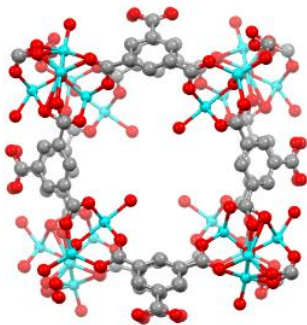
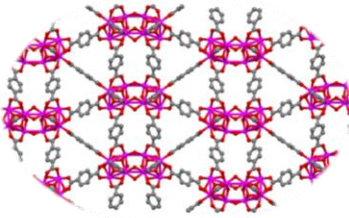
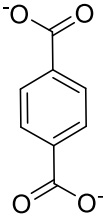
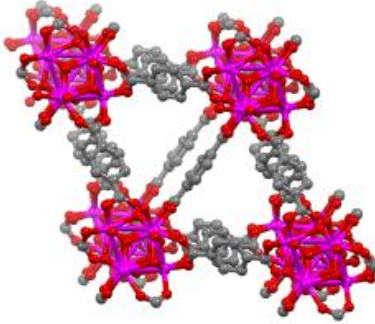
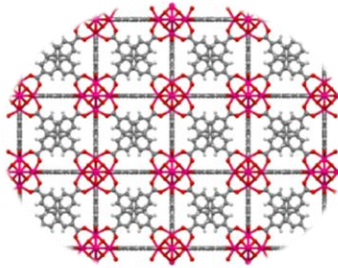
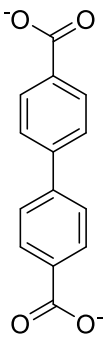
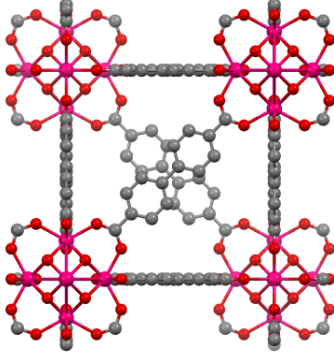
Por otra parte, se puede incorporar una molécula por **métodos no coordinativos**, donde no se forma ningún enlace covalente entre la estructura del MOF y el cromóforo. Dentro de estos métodos se señalan dos opciones: una de ellas consiste en formar el MOF y por incubación a cierta temperatura incorporar el cromóforo de interés, y la otra alternativa consiste en el ensamblaje del MOF alrededor del cromóforo, es decir, que la molécula orgánica se localice en el interior de la cavidad durante su formación. Esta última alternativa, conocida como **síntesis solvotérmica**, fue la elegida para realizar la síntesis de estas estructuras, ya que por experiencia del grupo de la Dra. Shustova, la primera alternativa, por lo general, resulta más difícil.

En la síntesis de estos materiales híbridos, Ch@MOF (cromóforo dentro del MOF), los criterios son: a) que el poro tenga la apertura suficiente para hospedar la molécula orgánica, b) que la emisión del MOF no interfiera con la de las muestras, y c) que los metales provenientes de las sales inorgánicas tengan configuraciones d^0 o d^{10} para evitar el *quenching*.¹³⁷ Esto último se debe a que metales con configuraciones paramagnéticas pueden apagar la señal fluorescente debido a los estados isoenergéticos $\pi\pi^*/dd$, que culminan en decaimientos no-radiativos.^{150,151}

Se trabajó con tres estructuras de MOFs: ZnBTC, UiO₆₆ y UiO₆₇, cuyas síntesis convencionales ya han sido informadas previamente, por lo que en la Tabla 4.4 se indica la fórmula química de cada

compuesto, como así también la estructura química del ligando. Además, a partir de la base de datos *online* del CCDC⁸ se accedió a las estructuras cristalinas de los mismos.

Tabla 4.4: resumen de las características de los MOFs por síntesis convencional

Abreviatura	Fórmula química y red cristalina	Ligando	Estructura cristalina y dimensión de la cavidad
ZnBTC	$Zn_3(BTC)_2$ 	BTC ³⁻ : benceno-1,3,5-tricarboxilato 	 ● Zn ● O 11 x 12 Å
UiO66	$Zr_6O_4(OH)_4(BDC)_6$ 	BDC ²⁻ : benceno dicarboxilato 	 ● Zr ● O 8 x 10 Å
UiO67	$Zr_6O_4(OH)_4(BPDC)_6$ 	BPDC ²⁻ : bifenil-4,4'-dicarboxilato 	 ● Zr ● O 13 x 16 Å

⁸Access Structures, the CCDC's and FIZ Karlsruhe's free service to view and retrieve structures.
<https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/>

Conociendo los materiales de partida, se realizaron las síntesis solvotérmicas de los Ch@MOF. Luego de cada proceso de síntesis, se corroboró la formación del MOF por PXRD (Anexo A.2) y, al observar las señales características del MOF se continuó adquiriendo la emisión de fluorescencia en sólido de cada muestra. Posteriormente, se realizaron curvas de calibración por UV-vis (Anexo A.3) de cada uno de los cromóforos que se presentan en la Figura 4.4, para cuantificar así la cantidad de cromóforo dentro del MOF.

Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 4.5, en la cual se puede apreciar los desplazamientos de las bandas de emisión de los Ch@MOF respecto de la emisión del cromóforo en estado sólido. Además, se indica la cantidad de compuesto dentro de la estructura del MOF. Para aquellos casos en donde no fue factible cuantificar se indica como " $<0,01\%$ ", que corresponde al límite de detección de las curvas de calibración realizadas por espectrofotometría UV-vis.

De la Tabla 4.5 se puede apreciar que para los compuestos **13(a-c)** la síntesis del Ch@ZnBTC no fue exitosa, ya que por PXRD se determinó que no se conformó la estructura del MOF, lo cual puede deberse a que el azufre de la tiona puede coordinar al metal, impidiendo que se lleve a cabo el autoensamblaje del MOF. Para las síntesis solvotérmica con los restantes derivados no se observó este suceso y, por PXRD se identificaron las señales características de cada estructura.

Continuando con el análisis de la Tabla 4.5, los compuestos **12(a-c)** se incorporaron efectivamente a los MOF de UiO₆₆, pero no así al UiO₆₇. Ambos MOFs poseen Zr como nodo metálico, y varían en el tamaño del poro debido a la estructura de sus ligandos. El UiO₆₇ posee un poro de 13 x 16 Å, mientras que el UiO₆₆ es de 8 x 10 Å; por lo que estas moléculas se lograron incluir dentro de un poro más pequeño, y su inclusión resultó ser menor del 0,8 %. A pesar de la poca proporción del compuesto dentro del UiO₆₆, se observó la emisión del mismo, la cual en todos los casos se desplazó a menores longitudes de onda. Respecto al ZnBTC, sólo el híbrido **12c@ZnBTC** presenta una leve emisión de fluorescencia, aunque no pudo cuantificarse si se incorporó efectivamente a la estructura del MOF.

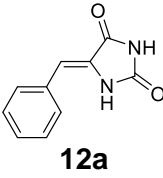
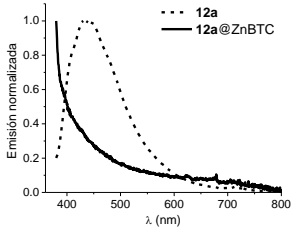
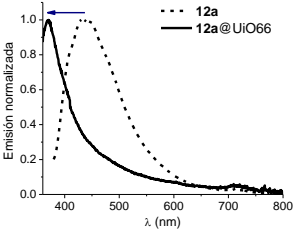
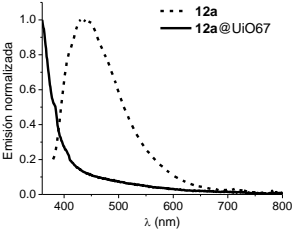
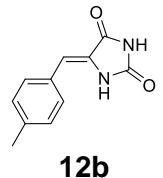
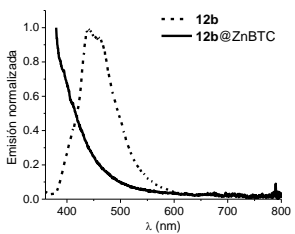
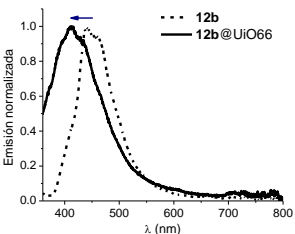
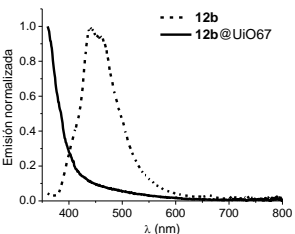
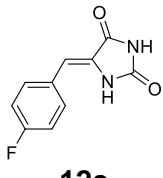
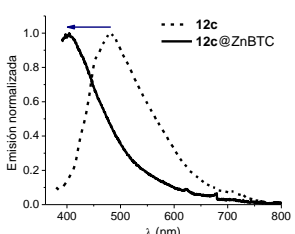
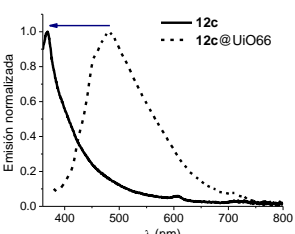
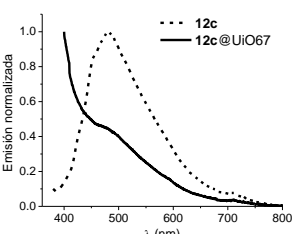
En cuanto a los compuestos azufrados **13(a-c)**, se lograron incorporar a los MOFs con nodos de Zr (UiO₆₆ y UiO₆₇). Cabe destacar que para los compuestos **13a@UiO₆₆** y **13c@UiO₆₆** se obtuvieron los mayores porcentajes de incorporación en las síntesis solvotérmicas llevadas a cabo. Resulta interesante resaltar cómo varían las bandas de emisión para un mismo compuesto dependiendo de la estructura en la cual se incluya. Por ejemplo, para el compuesto **13c** observamos un corrimiento

hipsocrómico en $13c@UiO66$, pero batocrómico para $13c@UiO67$. Estos desplazamientos se consideran en referencia a la emisión del sólido del compuesto puro.

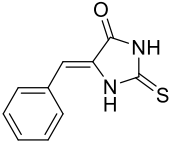
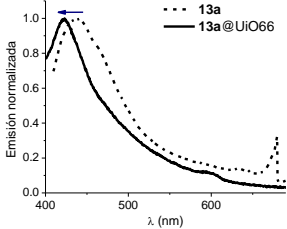
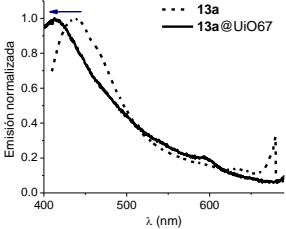
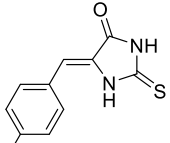
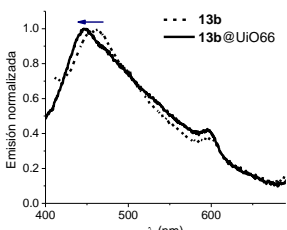
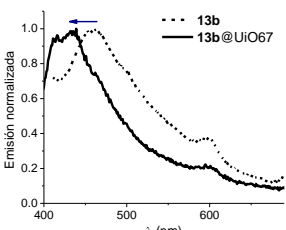
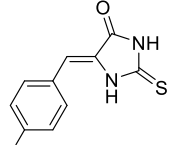
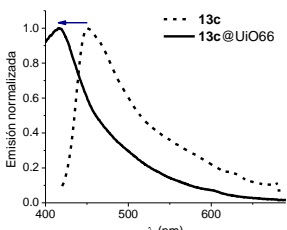
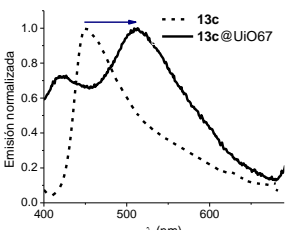
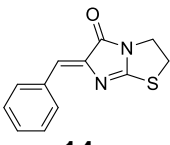
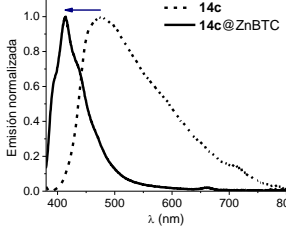
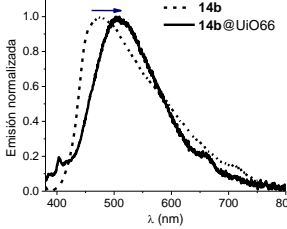
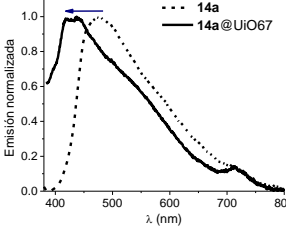
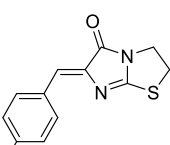
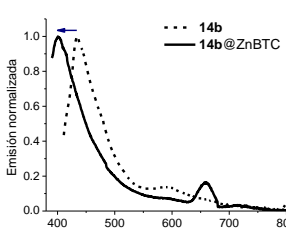
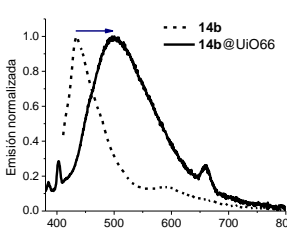
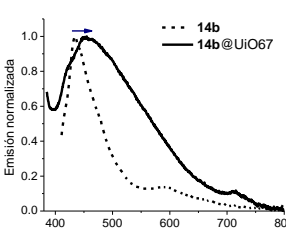
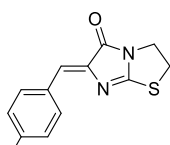
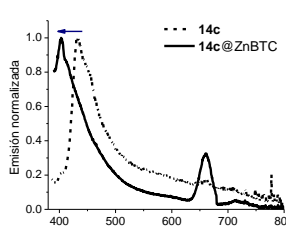
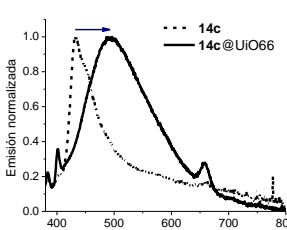
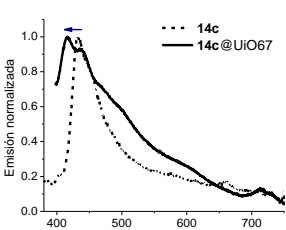
Por último, con los compuestos bicíclicos $14(a-c)$ no hubo inconvenientes y se incorporaron en todos los MOFs. Si bien el porcentaje de inclusión fue muy bajo en todos los casos, se pudo determinar su emisión. De este modo se observó un corrimiento de las bandas de emisión a menores longitudes de onda en ZnBTC y UiO67, sólo el $14b@UiO67$ presentó un corrimiento batocrómico diferenciándose de los demás. Por otro lado, para el UiO66 el desplazamiento fue a mayores longitudes de onda respecto a la emisión de las muestras sólidas.

Como se comentó en el párrafo anterior, y a pesar de los bajos porcentajes de los cromóforos dentro de los MOFs, se pudo detectar su emisión denotando que la inclusión de los mismos dentro de estas estructuras rígidas aumenta su fluorescencia. Como corolario, se diseñaron nuevas estructuras Ch@MOF las cuales, no sólo incrementaron la intensidad de la emisión, sino que también permitieron un desplazamiento en el espectro electromagnético entre los 400 y 513 nm.

Tabla 4.5: resumen de los Ch@MOF sintetizados por síntesis solvotérmica

Cromóforo	ZnBTC	UiO66	UiO67
 <p>12a</p>	 <p><0,01 %</p>	 <p>0,70 %, 370,5nm←429nm</p>	 <p><0,01 %</p>
 <p>12b</p>	 <p><0,01 %</p>	 <p>0,82 %, 413,5nm←442,5nm</p>	 <p><0,01 %</p>
 <p>12c</p>	 <p><0,01 %, 404nm←481nm</p>	 <p>0,72 %, 369nm←481nm</p>	 <p><0,01 %</p>

(continuación) Tabla 4.5: resumen de los Ch@MOF sintetizados por síntesis solvotérmica

Cromóforo	ZnBTC	UiO66	UiO67
 <p>13a</p>		 <p>2,80 %, 423nm←437nm</p>	 <p>0,51 %, 412,5nm←437nm</p>
 <p>13b</p>	No se formó el MOF	 <p>0,69 %, 446,5nm←460,5nm</p>	 <p>0,02 %, 439←460,5nm</p>
 <p>13c</p>		 <p>3,79 %, 415,5nm←450,5nm</p>	 <p>0,02 %, 450,5nm←513nm</p>
 <p>14a</p>	 <p>0,02 %, 414,5nm←473,5nm</p>	 <p>0,08 %, 473,5nm→509nm</p>	 <p>0,02 %, 437nm←473,5nm</p>
 <p>14b</p>	 <p>0,01 %, 400,5nm←433,5nm</p>	 <p>0,05 %, 433,5nm→500nm</p>	 <p>0,02 %, 433,5nm→455nm</p>
 <p>14c</p>	 <p>0,01 %, 403nm←432,5nm</p>	 <p>0,01 %, 432,5nm→496,5nm</p>	 <p>0,29 %, 416nm←432,5nm</p>

4.4 CONCLUSIONES

En este capítulo se logró estudiar la fotoisomerización y reversión térmica para los compuestos **13a-c** y **14a-c**. En cuanto a la isomerización $Z \rightarrow E$ se realizó con un láser de Nd-YAG, y no fue posible trabajar a potencias mayores a 20 mW debido a la fotólisis de los compuestos estudiados. Sin embargo, a partir de las investigaciones llevadas a cabo se obtuvieron las constantes de velocidad de la isomerización $Z \rightarrow E$, las cuales resultaron ser muy similares para todas las moléculas. Este proceso también pudo ser estudiado empleando una lámpara de luz continua de 356 nm, y monitoreando el proceso por RMN, se determinaron las poblaciones en el estado fotoestacionario.

Por otro lado, se realizaron diferentes determinaciones en cuanto a la reversión térmica de estos compuestos, lo cual fue dificultoso debido a que la misma demora días o semanas en volver a las proporciones de equilibrio. A partir de este estudio cinético se determinaron diferentes parámetros termodinámicos. Resulta importante destacar a través de la **teoría isocinética** se postula que el mecanismo de reversión térmica es el mismo para las moléculas en estudio, pues sus ΔG^\ddagger son muy similares.

Por otra parte, fue posible estudiar la fotofísica de estas moléculas en estructuras más complejas, como ADN y MOFs. En cuanto a las interacciones con ADN se observó que el compuesto **13a** aumenta notablemente su intensidad de fluorescencia en presencia de esta biomolécula, en comparación con las otras moléculas estudiadas.

En cuanto a la síntesis solvotérmica de los compuestos **12a-c**, **13a-c** y **14a-c** en tres estructuras diferentes de MOF: ZnBTC, UiO₆₆ y UiO₆₇, se pudo observar que en todos los casos se logró el autoensamblaje correspondiente, a excepción de los compuestos **13a-c** que no permitieron la formación del ZnBTC. En los otros casos se dio lugar a la formación del MOF, y trabajando con la estructura del UiO₆₆ se logró la incorporación de cada una de las moléculas estudiadas en este apartado. En cuanto a las emisiones de fluorescencia de las estructuras Ch@UiO₆₆, las mismas ocupan el intervalo de 370 a 496 nm, cubriendo la zona del violeta y el azul en el espectro electromagnético.

Página en blanco

4.5 SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.5.1 Fotoisomerización láser

Para la fotoisomerización se empleó un láser de frecuencia triplicada de Nd:YAG (Quantel Brilliant-B, 355 nm; 10 Hz). Para el arreglo experimental se enfocó el láser a una celda de cuarzo, alcanzando potencias de 18 mW. No se pudo trabajar a potencias más altas debido a que se observó la fotólisis de las muestras; tampoco se pudo bajar aún más la potencia ya que estaría por debajo del límite de detección de la misma.

La fotoisomerización se siguió por espectroscopía UV-vis, adquiriendo los espectros en un espectrofotómetro UV-1601 Shimadzu, usando una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

4.5.2 Reversión térmica

Estos experimentos se realizaron en una pasantía en la Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Carolina del Sur, EEUU; bajo la supervisión de la Dra. Shustova.

Se prepararon las siguientes soluciones en CD₃CN en tubos de RMN: **13a** (4,1 mM); **13b** (3,7 mM); **13c** (1,9 mM); **14a** (2,8 mM); **14b** (2,9 mM); **14c** (3,5 mM).

Para fotoisomerizar las muestras de *Z*→*E* se empleó una lámpara de luz continua THORLABS M365L2, con una $\lambda=365$ nm.

La reversión térmica se realizó a varias temperaturas en el intervalo de 55 °C a 75 °C, monitoreada por RMN Bruker Avance III-HD 300 MHz. Los tubos de RMN se acomodaron en un incubador en viales con arena, protegidos de la luz y controlando que no hubiese variaciones de temperatura durante la incubación. Las mediciones se realizaron a diferentes tiempos, y se descontó el tiempo de adquisición para los cálculos cinéticos. Previamente se corroboró la ausencia de reversión térmica a temperatura ambiente durante el tiempo de adquisición.

4.5.3 Interacción de los 1,3-heterociclos con ADN doble hebra

Los espectros de fluorescencia fueron adquiridos usando un espectrofotómetro PTI QM2 (Quanta Master 2) de *Photon Technology International* con una lámpara pulsada de Xe (75 W). Para todas las adquisiciones, la longitud de onda de excitación fue 307 nm.

Al trabajar con ADN es importante controlar no sólo la temperatura, sino también el pH del medio. Por este motivo, todo el sistema estuvo termostatzado a 30 °C y las disoluciones se prepararon en un buffer TE, el cual consiste en Tris 10 mM y EDTA 1 mM, ajustando el pH a 7,4.

4.5.4 Síntesis y caracterización de los 1,3-heterociclos dentro de MOFs

Los espectros de emisión fueron adquiridos en un fluorímetro Edinburgh FS5 equipado con una lámpara de excitación de Xe de onda continua 150 W. Las muestras sólidas se acomodaron dentro de un porta-muestra de cuarzo de 0,5 mm de paso óptico.

La síntesis de los Ch@MOF se realizaron en viales de vidrio cerrados, acomodados en bloques de aluminio tipo Stuart, los cuales se incubaron en muflas, con control de tiempo y temperatura.

Síntesis de Ch@ZnBTC

Se preparó una solución a partir de 0,2190 g de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y 0,1638 g de H_3BTC en 30 mL de DMF y se sonicó por 10 minutos. Posteriormente se incorporó en viales de 10 mL aproximadamente 20 mg de los compuestos **12(a-c)**, **13(a-c)** y **14(a-c)**. Seguidamente se adicionó en cada vial 5 mL de la solución preparada inicialmente, y se dejó 4 días a 70 °C.

Síntesis de Ch@UiO67

En un vial de 10 mL se incorporaron 0,002 g de $ZrCl_4$ y 0,002 g de H_2BPDC , para luego adicionar 1 mL de DMF y sonicar hasta obtener una solución. Seguidamente, se adicionó 10 μ L de ácido trifluoro acético y 10 mg de los compuestos **12(a-c)**, **13(a-c)** y **14(a-c)**. Finalmente, se incubó durante 72 h a 120 °C.

Síntesis de Ch@UiO67

En un vial de 20 mL se incorporaron 0,016 mg de $ZrCl_4$; 0,25 g de ácido benzoico y 0,011 g de BDC. Seguidamente, se adicionan 4 mL de DMF y se sonicó hasta obtener una solución. Luego, se incorporaron 50 mg de los compuestos **12(a-c)**, **13(a-c)** y **14(a-c)** y se sonicó nuevamente hasta observar una sola fase. Finalmente, se incubó durante 72 h a 120 °C.

Conclusiones Generales

A partir de los 1,3- diaza heterociclos de hidantoína **15** y tiohidantoína **16** se generaron otros derivados en condensación con diversos aldehídos; construyendo así una biblioteca de catorce compuestos heterocíclicos. De este modo, se mejoraron las condiciones de síntesis, empleando la metodología de microondas como una alternativa más eco-amigable. Luego se la síntesis, se evaluaron diversas actividades biológicas, y de los resultados se observó que las moléculas azufradas, en general, presentan mayor actividad antioxidante. Además, se obtuvieron resultados muy interesantes respecto a la actividad moduladora de los compuestos fluorados de esta familia de fenil metilen-(tio)-hidantoínas.

Se obtuvieron tres bicíclicos fusionados con diferente sustituyente bencilideno. Además, se estudió su mecanismo de reacción, optimizando las condiciones de síntesis. Asimismo, se sintetizaron nuevos derivados de tiohidantoína **16** generando interesantes heterociclos trifluorometilados, los cuales no han sido descritos hasta el momento.

Conjuntamente, se continuó con el estudio de 1,3-diaza heterociclos, desde el enfoque fotoquímico. En primer lugar, se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas en cuanto a la fotoisomerización, y posteriormente a partir del estudio cinético de la reversión térmica se determinaron los parámetros de ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger y ΔG^\ddagger para este proceso. Por su parte, se exploraron sus potencialidades como biomarcadores en interacción con ADN doble hebra. Finalmente, se diseñaron estructuras más complejas en MOFs, estudiando sus propiedades fotofísicas, ahora en estado sólido. De este modo, luego de la síntesis de los compuestos, se pudo conocer un poco más de sus propiedades.

Página en blanco

Anexos

Página en blanco

A1. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

A.1.1. Equipos y metodologías utilizados

Los espectros de CG-EM se realizaron en un equipo de CG (con una columna SE-30, He como gas de elución a un flujo de 1 mL/min; acoplado a un espectrómetro de masas (IE utilizando 70 eV).

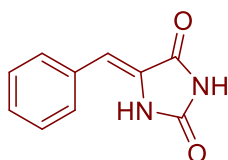
En algunos casos se determinó la masa en alta resolución mediante HR-MS en la Universidad de Vigo (España).

Los espectros de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker DRX de 400 MHz (en CDCl_3 , DMSO-d_6 o acetona- d_6). Los corrimientos químicos se expresan en ppm (δ) relativos a TMS como referencia interna y los valores de las constantes de acoplamiento J se informan en Hz.

La caracterización por espectroscopía infrarroja fue realizada con el espectrofotómetro con transformada de Fourier FTIR Bruker IFS28. Para el análisis de muestras líquidas o sólidas, se realizaron pastillas de KBr 99% conteniendo la muestra.

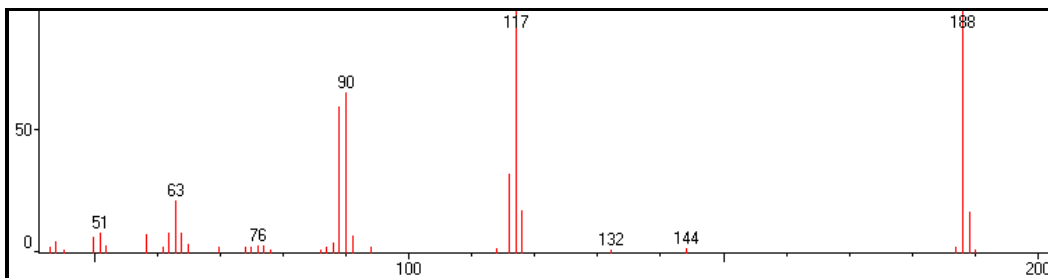
Los espectros UV-vis se obtuvieron con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y ACN grado HPLC como solvente.

5-bencilidenimidazolidin-2,4-diona **12a**

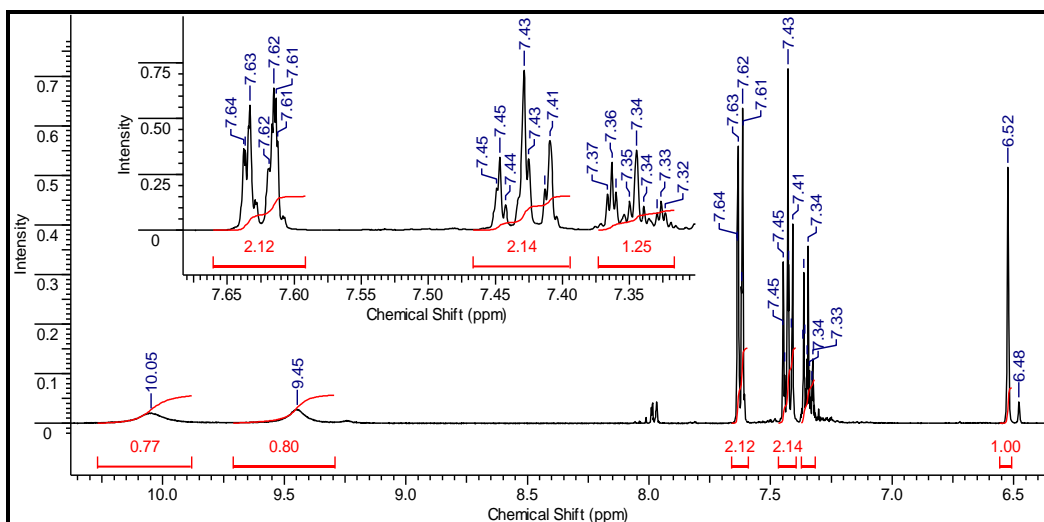


Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$
m/z (M^+) calculada: 188,0586

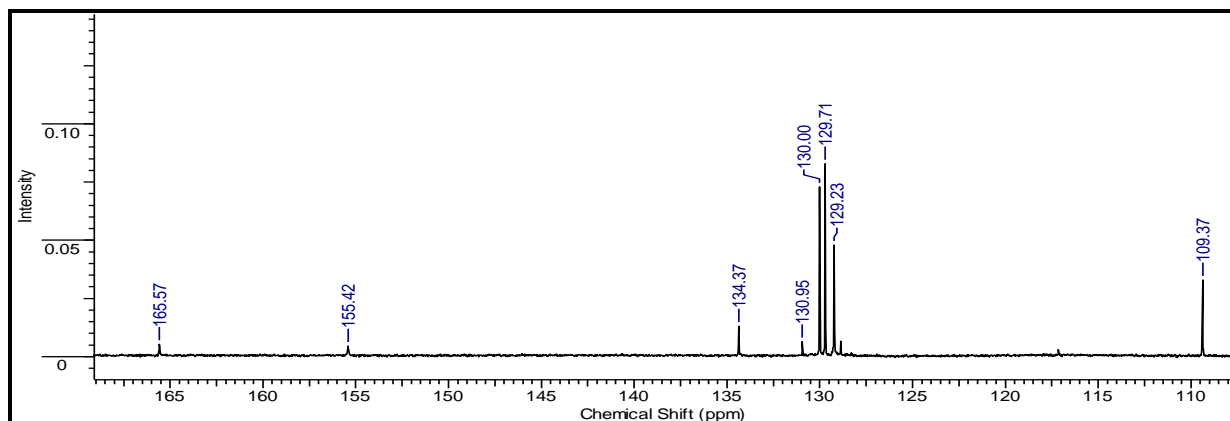
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 10,852 min): m/z (%) = 189 ($\text{M}+1$, 17), 188 (M^+ , 69), 117 (100), 90 (38), 89 (40), 63 (7), 43 (26).



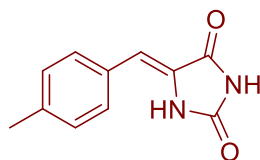
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, acetona- d_6 , 22°C) δ (ppm): 6,52 (s, 1H); 7,34 (t,t; $J_1=7,75$ Hz; $J_2=1,59$ Hz; 1H); 7,43 (dd,t; $J_1=7,75$ Hz; $J_2=1,59$ Hz; 2H), 7,63 (dd, $J_1=7,75$ Hz; $J_2=0,54$ Hz; 2H), 9,45 ($s_{\text{(móvil)}}$, 1H); 10,05 ($s_{\text{(móvil)}}$, 1H).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 109,97; 129,23; 129,71 (2C); 130,00 (2C); 130,95; 134,37; 155,42; 165,57.



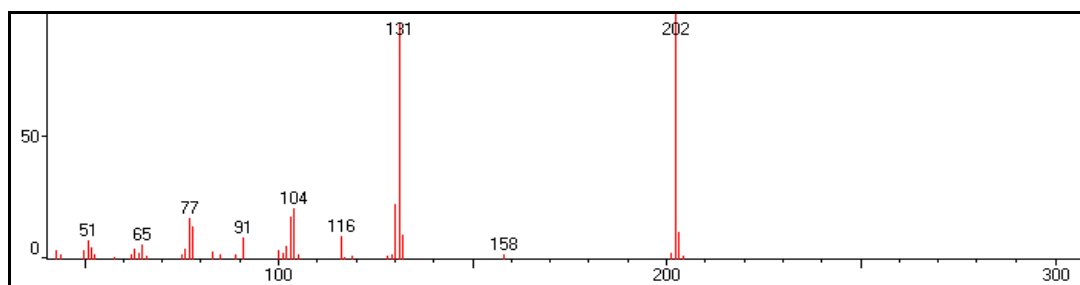
5-(4-metilbenzilen) imidazolidin-2,4-diona **12b**



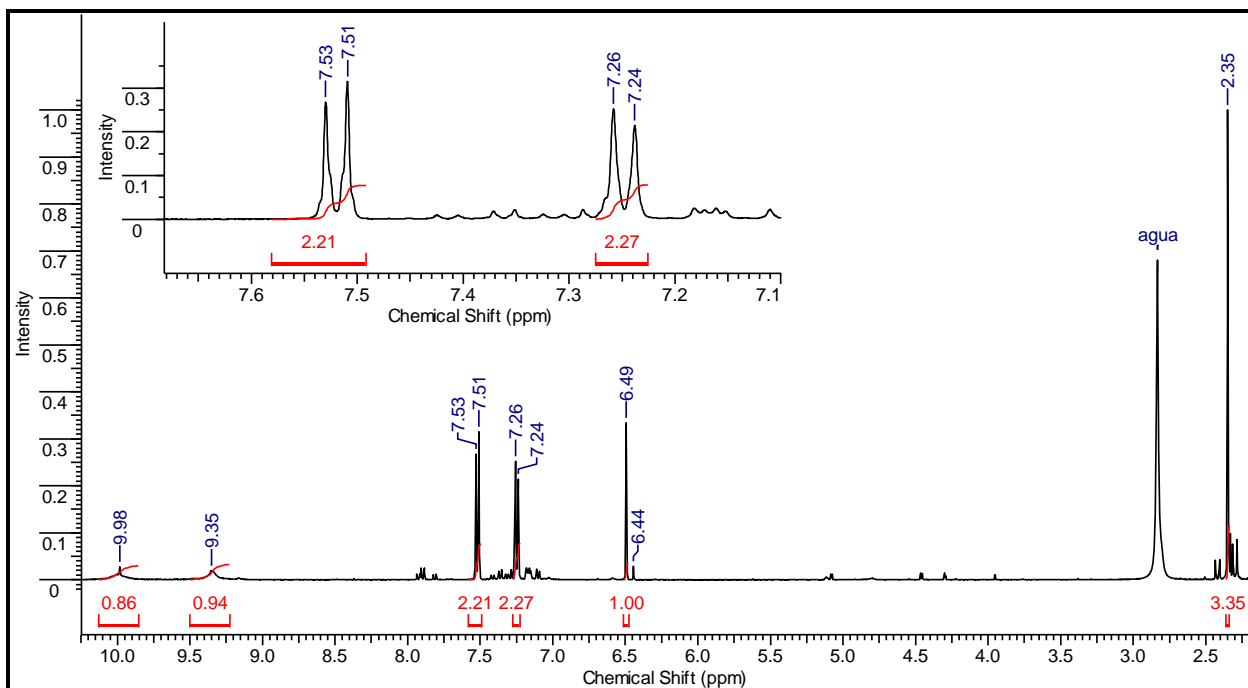
Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$

m/z (M^+) calculada: 202, 0742

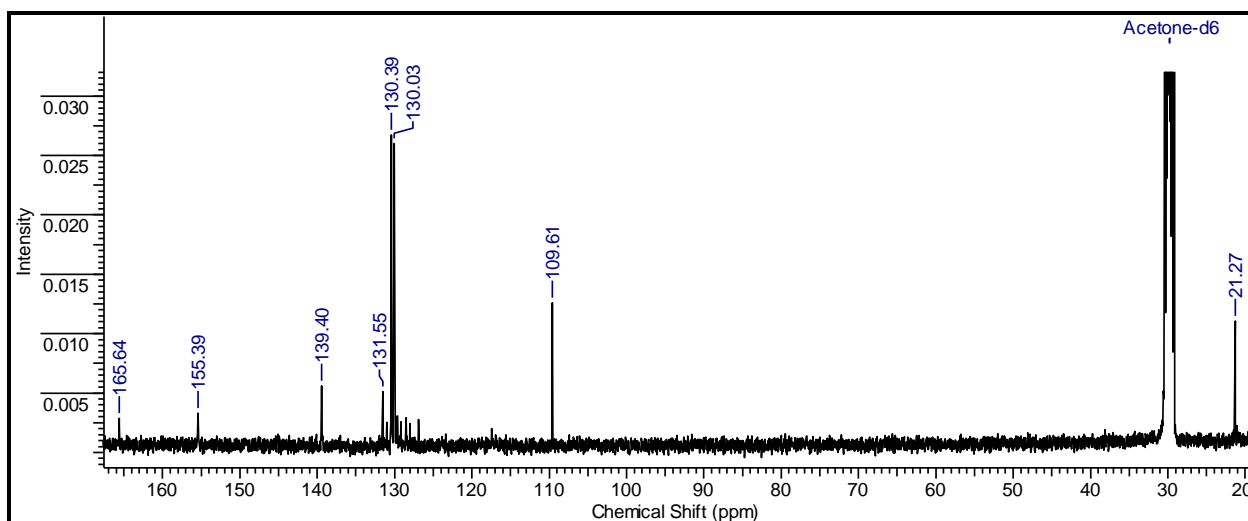
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 10,852 min): m/z (%) = 203 ($\text{M}+1$, 11), 202 (M^+ , 100), 131 (96), 116 (9), 104 (24), 103 (17), 91 (9), 78 (13), 77 (16), 65 (6), 51 (8).



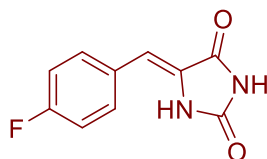
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, acetona- d_6 , 22°C) δ (ppm): 2,35 (s, 3H); 6,49 (s, 1H); 7,25 (d; $J_I=8,10$ Hz; 2H); 7,52 (d; $J_I=8,10$ Hz; 2H), 9,35 (s(móvil), 1H); 9,98 (s(móvil), 1H).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 21,27; 109,97 (2C); 129,23; 129,71 (2C); 130,00 (2C); 130,95; 134,37; 155,42; 165,57.

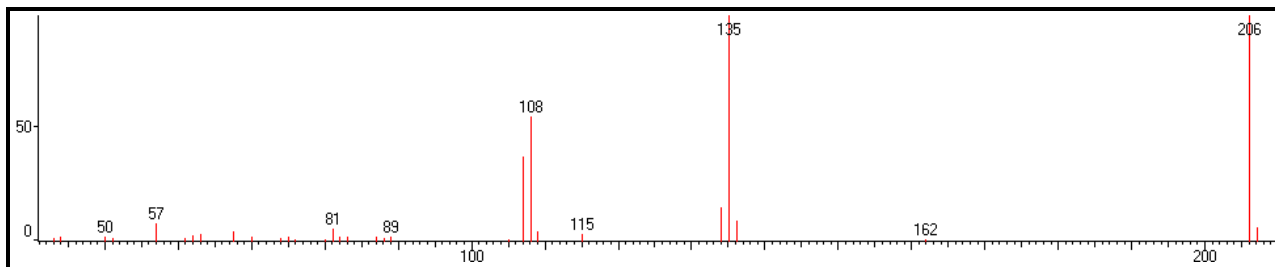


5-(4-fluorobenciliden)imidazolidin-2,4-diona **12c**

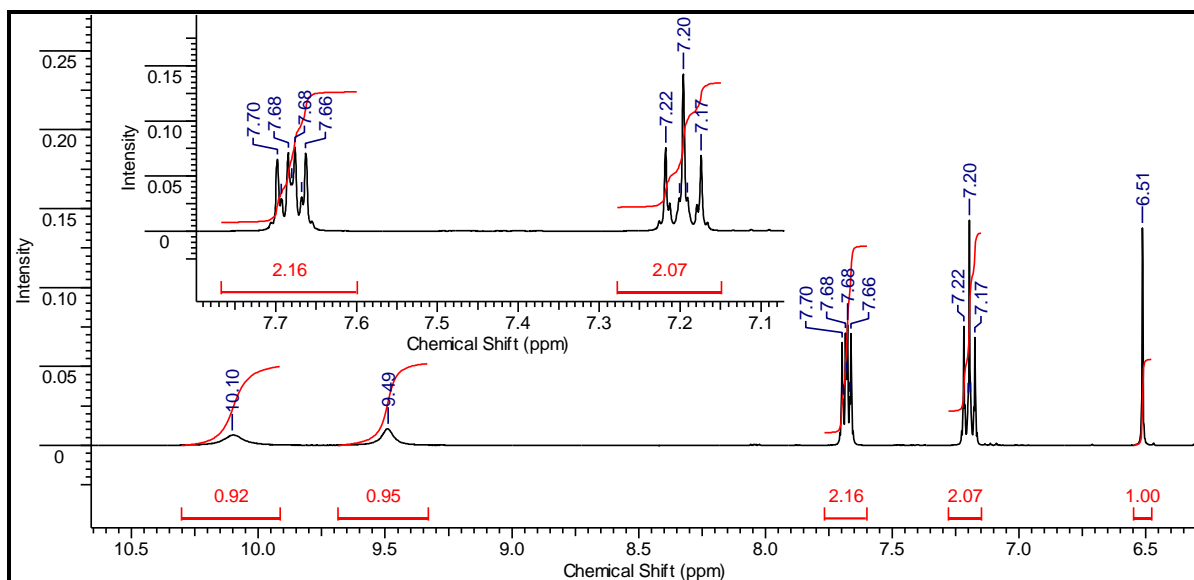


Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{FN}_2\text{O}_2$
 m/z (M^+) calculada: 206,0492

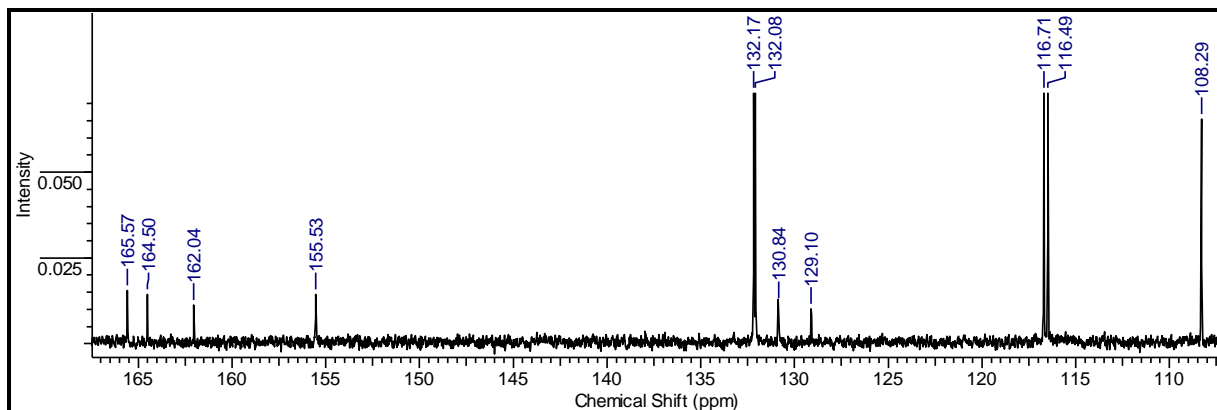
CG-EM (200 a 250 °C, 10 °C/min; t_R : 7,222 min): m/z (%) = 206 (M^+ , 99), 136 (9), 135 (100), 134 (15), 108 (54), 107 (37), 81 (5), 57 (8).



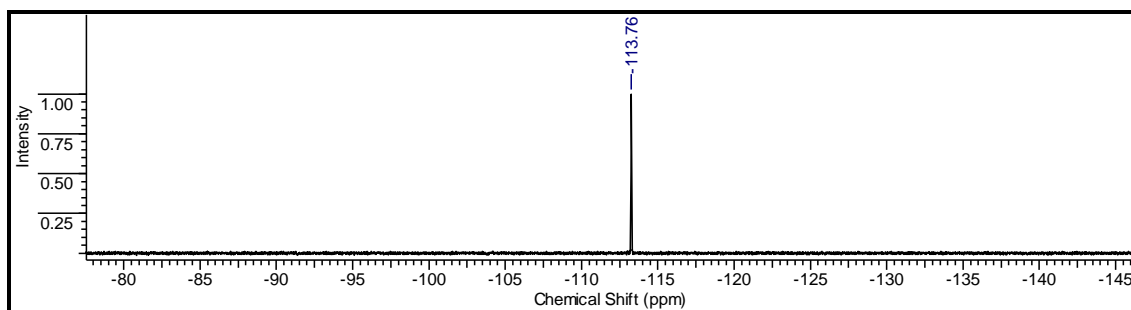
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, acetona- d_6 , 22°C) δ (ppm): 6,51 (s, 1H); 7,20 (t,t; $J_1=8,78$ Hz; $J_2=2,41$ Hz, 2H); 7,68 (m; 2H), 9,49 (S(móvil), 1H); 10,10 (S(móvil), 1H).



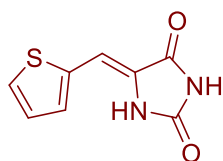
$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 108,29; 116,60 ($J_2^{C-F}=22,22$ Hz; 2C); 129,10; 130,84; 132,13 ($J_3^{C-F}=8,75$ Hz; 2C); 155,53; 163,27 ($J_1^{C-F}=247,73$ Hz); 165,57.



^{19}F -NMR (376,53 MHz; acetona- d_6) δ (ppm): -113,76.



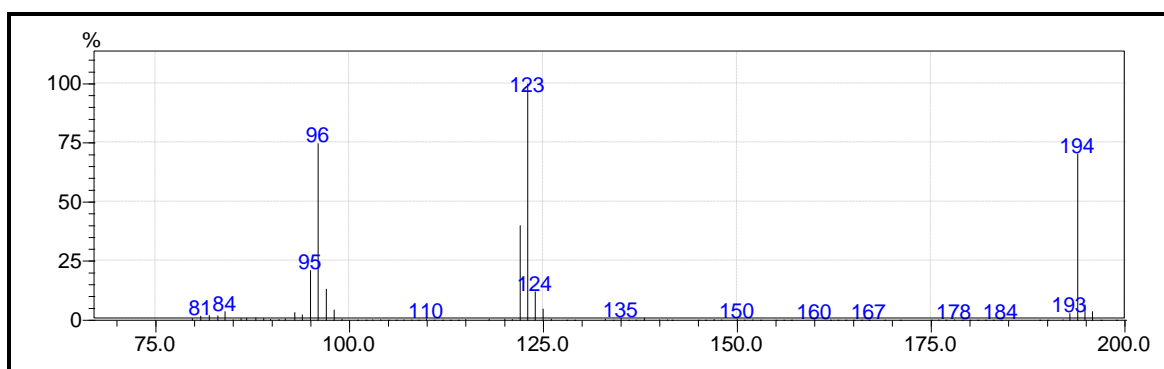
5-(tiofen-2-il metilen) imidazolidin-2,4-diona **12d**



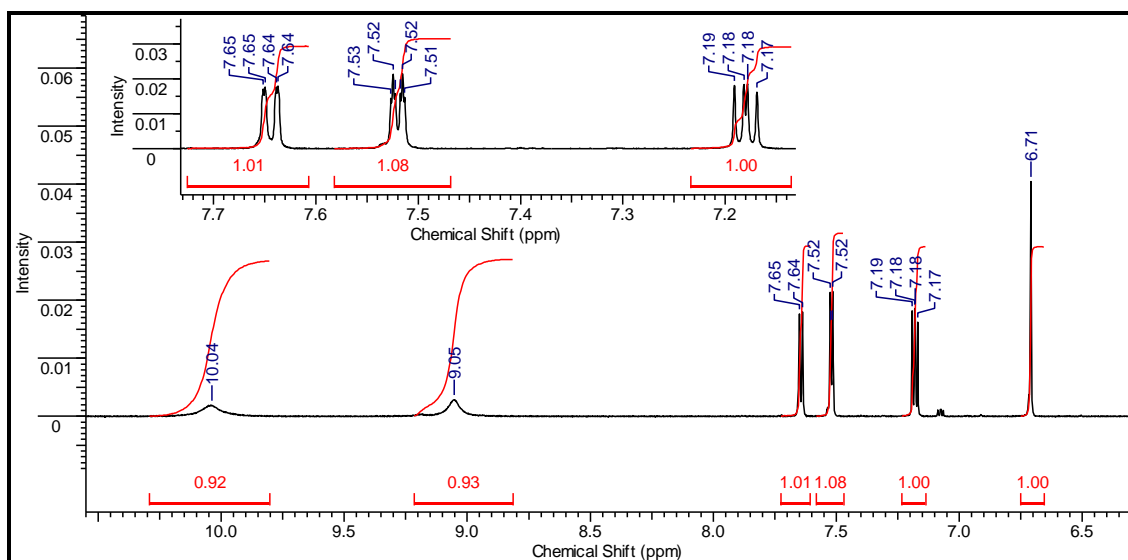
Fórmula molecular: $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

m/z (M^+) calculada: 194,0150

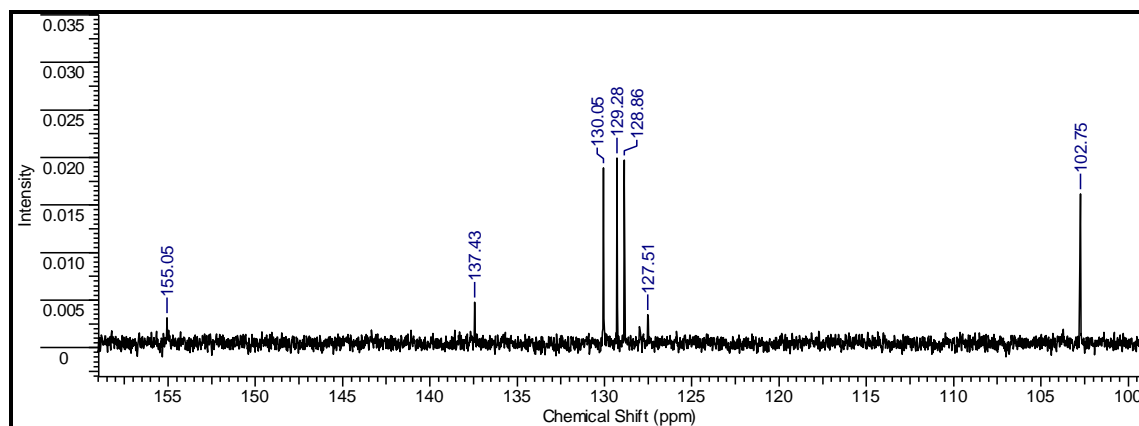
CG-EM (150 a 250 $^\circ\text{C}$, 15 $^\circ\text{C}/\text{min}$; t_{R} : 12,010 min): m/z (%) = 195 ($\text{M}+1$, 7), 194 (M^+ , 70), 193 (3), 124 (12), 123 (100), 122 (40), 98 (4), 97 (13), 96 (75), 95 (21), 84 (4).



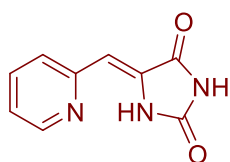
^1H -NMR (400,16 MHz, acetona- d_6 , 22 $^\circ\text{C}$) δ (ppm): 6,71 (s, 1H); 7,18 (dd; $J_1=4,91$ Hz; $J_2=3,72$ Hz, 1H); 7,52 (d,t; $J_1=3,72$ Hz; $J_2=0,66$ Hz, 1H), 7,65 (d,t; $J_1=4,91$ Hz; $J_2=0,66$ Hz, 1H), 9,05 (s(móvil), 1H); 10,04 (s(móvil), 1H).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 102,75; 128,86; 129,28; 130,05; 137,43; 155,05; 165,25.



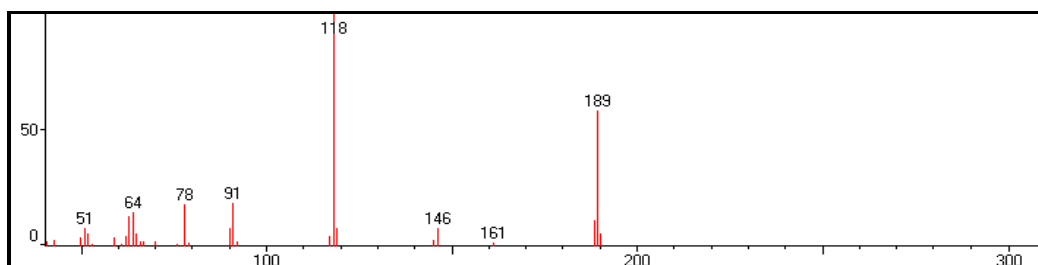
5-(piridin-2-il metilen) imidazolidin-2,4-diona **12e**



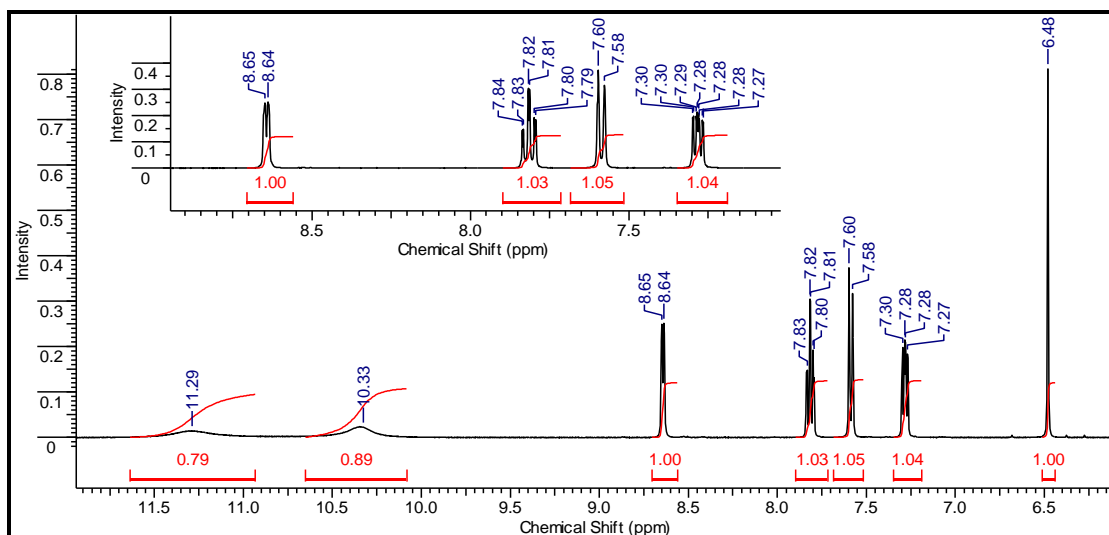
Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$

m/z (M^+) calculada: 189,0538

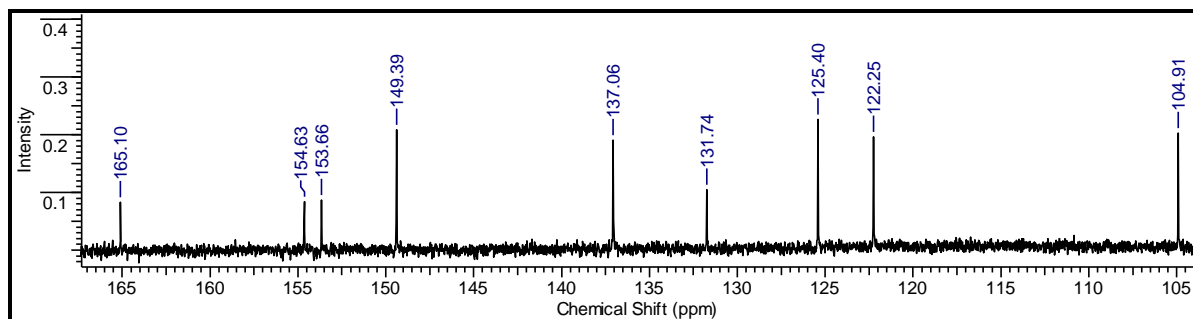
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_r : 7,318 min): m/z (%) = 190 ($\text{M}+1$, 6), 189 (M^+ , 58), 146 (8), 118 (100), 91 (18), 78 (18), 64 (14), 51 (7).



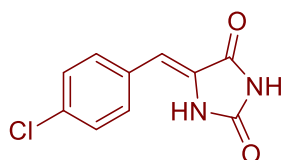
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 22°C) δ (ppm): 6,48 (s, 1H); 7,28 (dd,d; $J_1=7,44$ Hz; $J_2=4,80$ Hz; $J_3=1,44$ Hz, 1H); 7,59 (d; $J_1=7,66$ Hz, 1H), 7,65 (t,d; $J_1=7,66$ Hz; $J_2=1,44$ Hz, 1H), 8,65 (d; $J_1=4,80$ Hz, 1H), 10,33 (s(móvil), 1H); 11,29 (s(móvil), 1H).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 104,91; 122,25; 125,40; 131,74; 137,06; 149,39; 153,66; 154,63; 165,10.

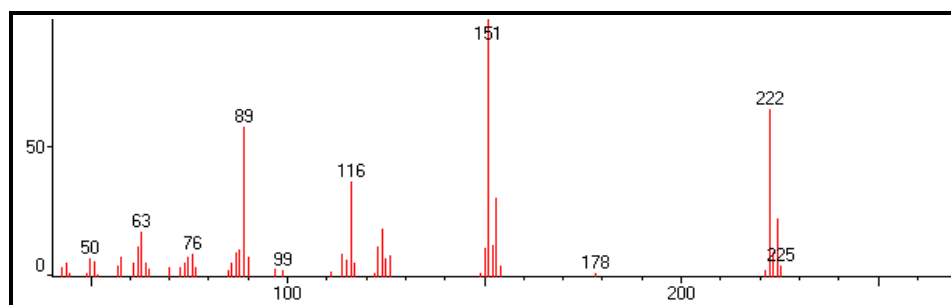


5-(4-clorobenciliden) imidazolidin-2,4-diona 12f

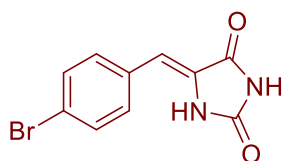


Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_2$
 m/z ($\text{M}^+ \text{Cl}^{35}$) calculada: 222,0196
 m/z ($\text{M}^+ \text{Cl}^{37}$) calculada: 224,0167

CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 9,289 min): m/z (%) = 224 ($\text{M}^+ \text{Cl}^{37}$, 22), 222 ($\text{M}^+ \text{Cl}^{35}$, 65), 153 (31), 151 (100), 124 (19), 116 (37), 76 (9), 63 (17), 50 (7).

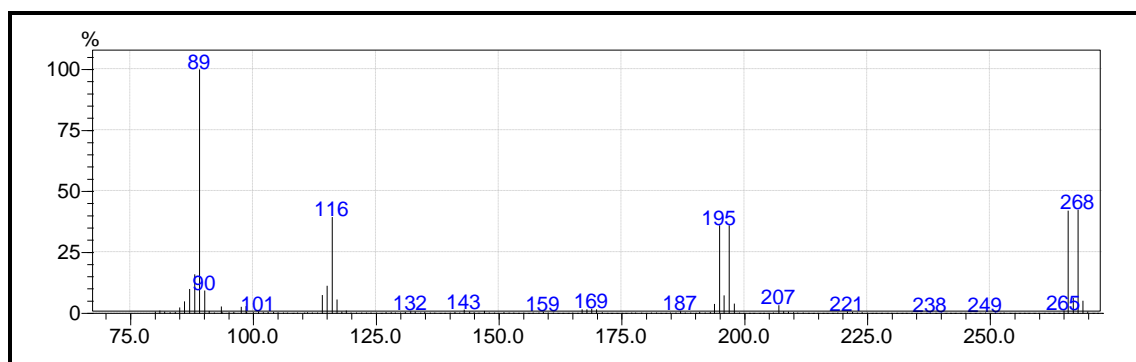


5-(4-bromobenciliden) imidazolidin-2,4-diona 12g

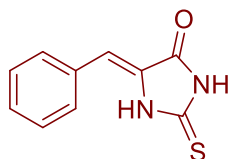


Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_2$
 m/z ($\text{M}^+ \text{Br}^{79}$) calculada: 265,9691
 m/z ($\text{M}^+ \text{Br}^{81}$) calculada: 267,9670

CG-EM (150 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 14,521 min): m/z = 268 ($\text{M}^+ \text{Br}^{81}$, 42), 266 ($\text{M}^+ \text{Br}^{79}$, 42), 197 (36), 196 (7), 195 (36), 117 (6), 116 (39), 115 (11), 114 (8), 90 (10), 89 (100), 88 (15), 87 (10).

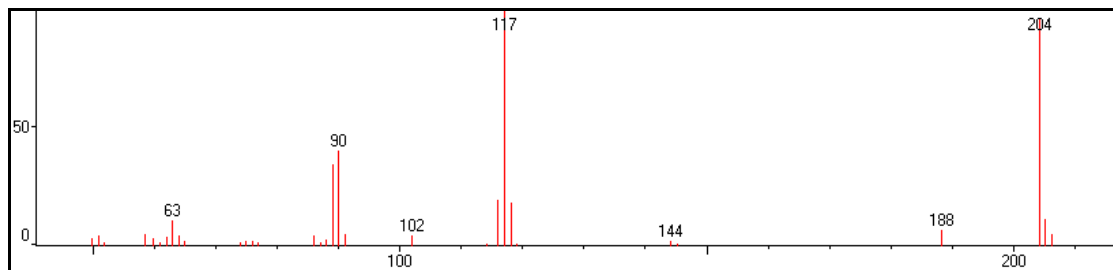


5-benciliden-2-tioximidazolidin-4-ona **13a**

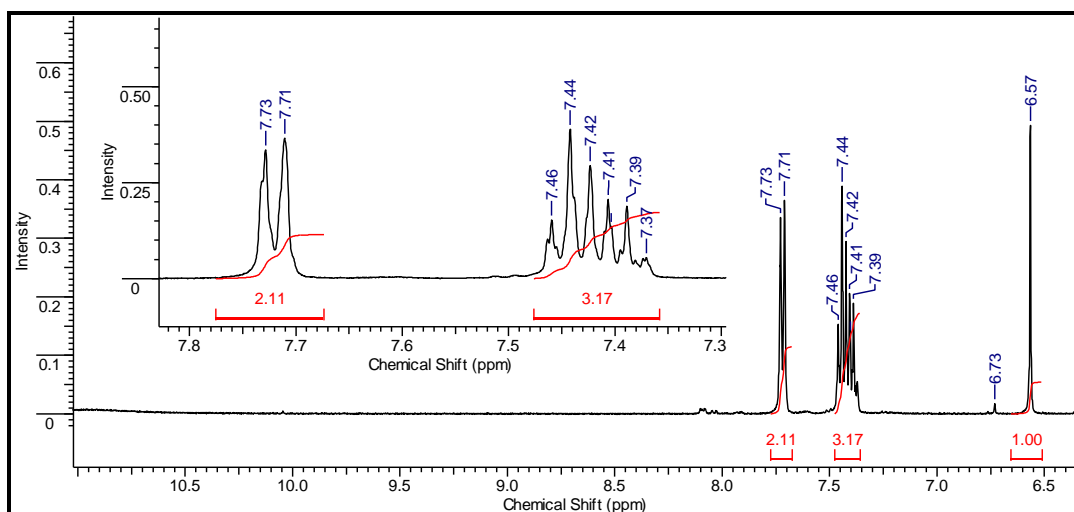


Fórmula molecular: C₁₀H₈N₂OS
m/z (M⁺) calculada: 204,0357

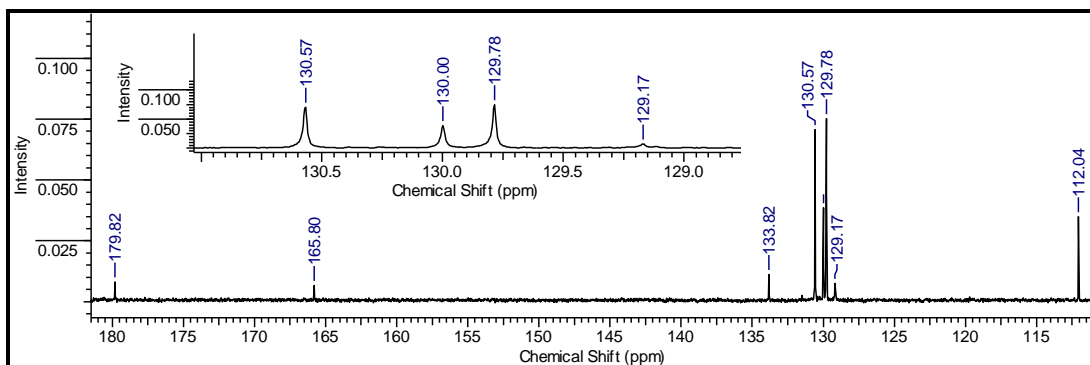
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R: 8,427 min): m/z (%) = 205 (M+1, 7), 204 (M⁺, 68), 188 (19), 172 (10), 118 (16), 117 (100), 116 (20), 91 (7), 90 (44), 89 (40), 63 (13), 43 (8).



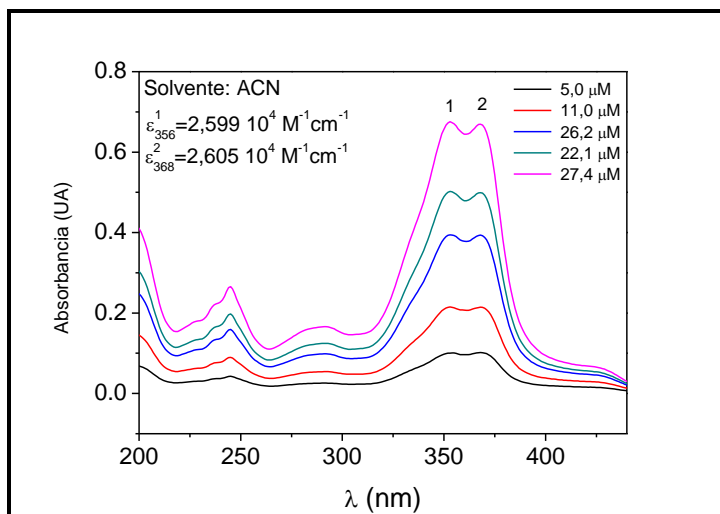
¹H-NMR (400,16 MHz, acetona-d₆, 22°C) δ (ppm): 6,57 (s, 1H); 7,42 (m, 3H); 7,72 (d; J_I=7,15 Hz; 2H).



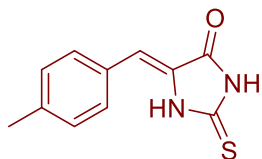
¹³C-NMR (100,56 MHz, acetona-d₆) δ (ppm): 112,04; 129,17; 129,78; 130,00; 130,57; 165,80; 179,82.



UV-Vis (ACN): $\epsilon_{356} = 2,60 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{368} = 2,61 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

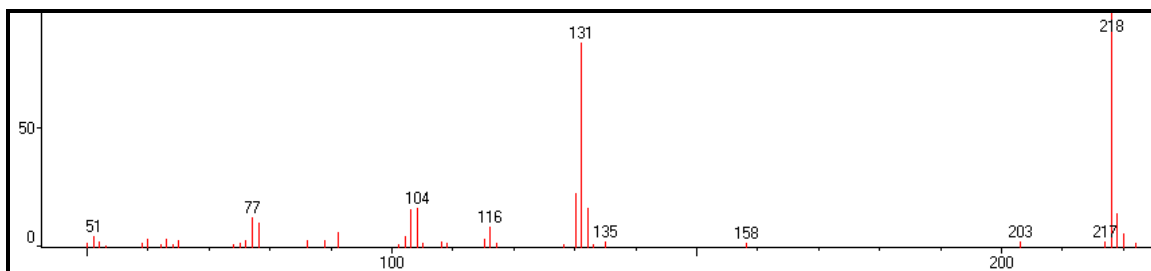


5-(4-metilbencilidene)-2-tioimidazolidin-4-one **13b**

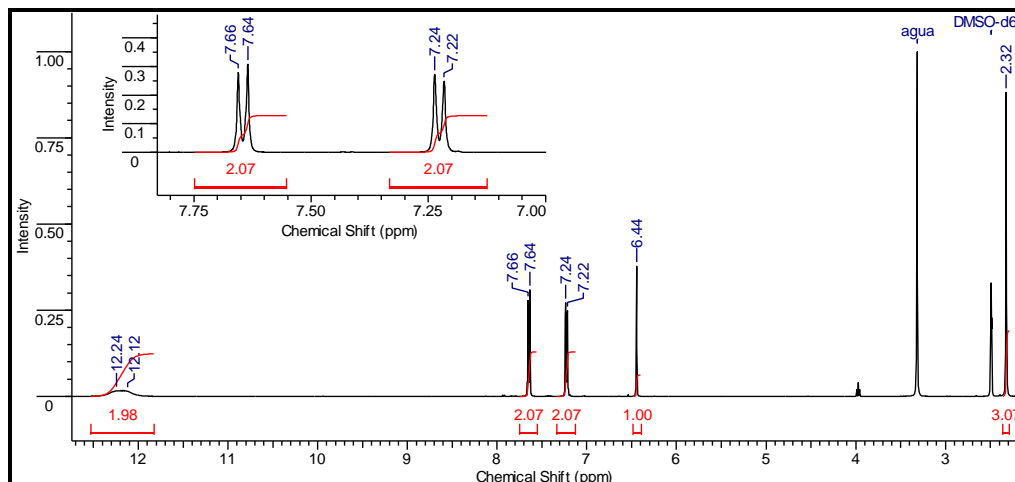


Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$
 m/z (M^+) calculada: 218,0514

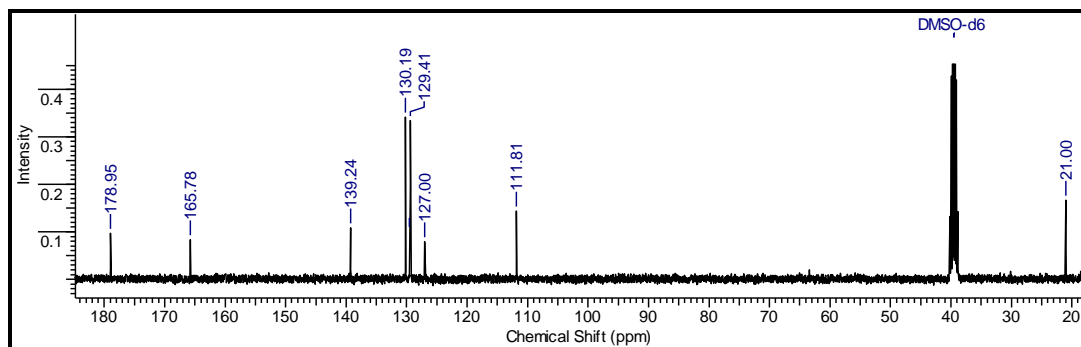
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 13,245 min): m/z (%) = 219 ($\text{M}+1$, 14), 218 (M^+ , 100), 132 (17), 131 (87), 130 (23), 116 (9), 116 (20), 104 (17), 103 (16), 91 (6), 78 (10), 77 (13), 51 (5).



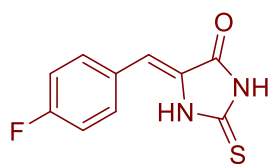
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, DMSO-d_6 , 22°C) δ (ppm): 2,32 (s, 3H); 6,44 (s, 1H); 7,23 (d; $J_I=8,10$ Hz; 2H); 7,65 (d; $J_I=8,10$ Hz; 2H), 12,12 (s(móvil), 1H); 12,24 (s(móvil), 1H).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 21,00; 111,81 (2C); 127,00; 129,41 (2C); 130,19 (2C); 139,24; 165,95; 178,95.



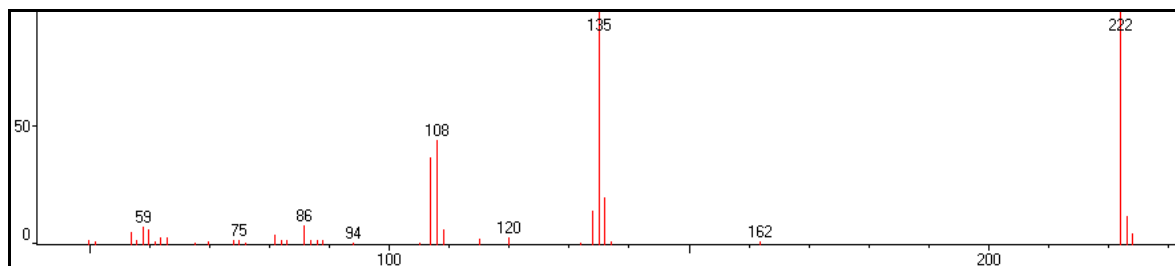
5-(4-fluorobenciliden)-2-tioximidazolidin-4-ona 13c



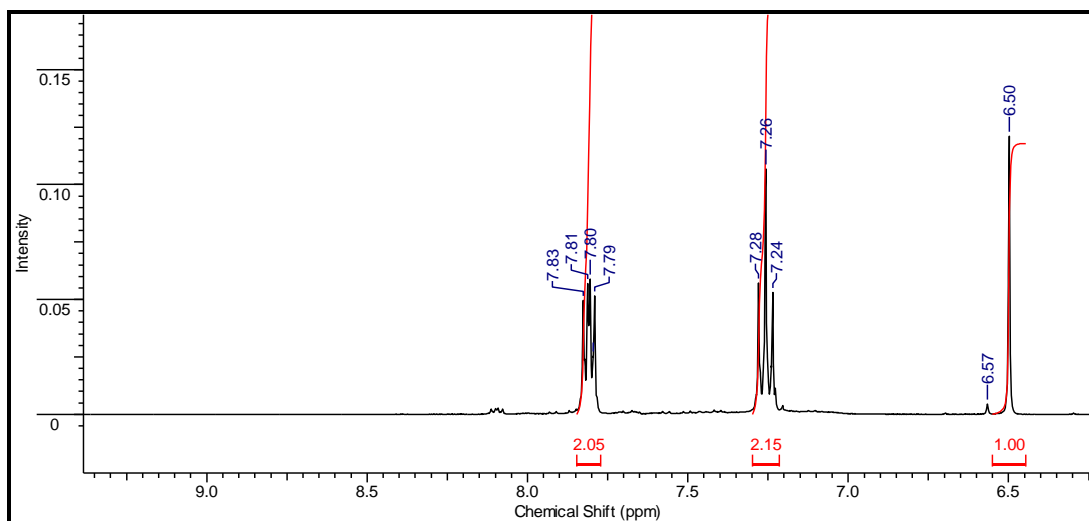
Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{FN}_2\text{OS}$

m/z (M^+) calculada: 222,0263

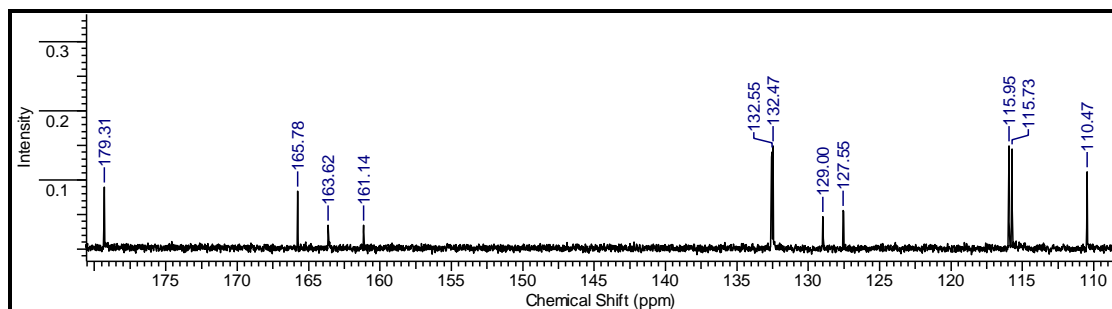
CG-EM (100 a 250 $^{\circ}\text{C}$, 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; t_{R} : 12,102 min); m/z = 223 ($\text{M}+1$, 12), 222 (M^+ , 99), 136 (20), 135 (100), 134 (14), 108 (44), 116 (20), 107 (37), 86 (8), 59 (8).



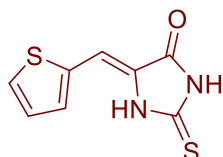
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, acetona- d_6 , 22 $^{\circ}\text{C}$) δ (ppm): 6,50 (s, 1H); 7,26 (t; $J_1=8,92$ Hz; 2H); 7,81 (dd; $J_1=8,92$ Hz; $J_2=5,58$ Hz ; 2H).



^{13}C -NMR (100,56 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 110,47; 115,84 ($J_2^{C-F}=21,61$ Hz; 2C); 127,75; 129,00; 132,51 ($J_3^{C-F}=8,18$ Hz; 2C); 162,38 ($J_1^{C-F}=248,74$ Hz); 165,78; 179,31.



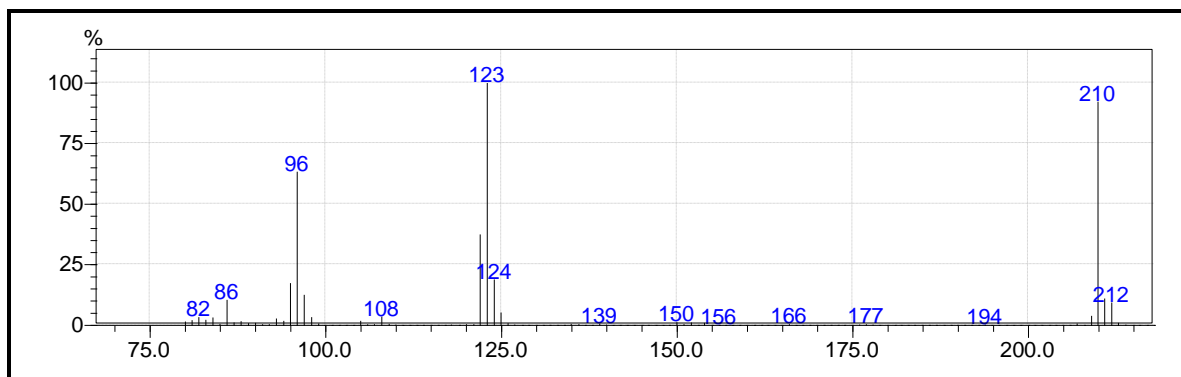
5-(tiofen-2-il metilen) 2-tioxoimidazolidin-4-ona 13d



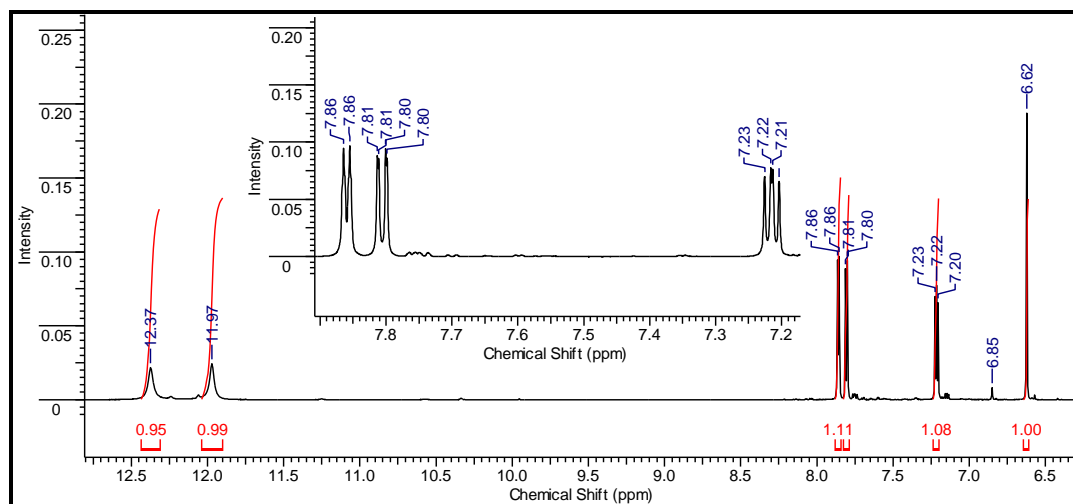
Fórmula molecular: $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{OS}_2$

m/z (M^+) calculada: 209,9922

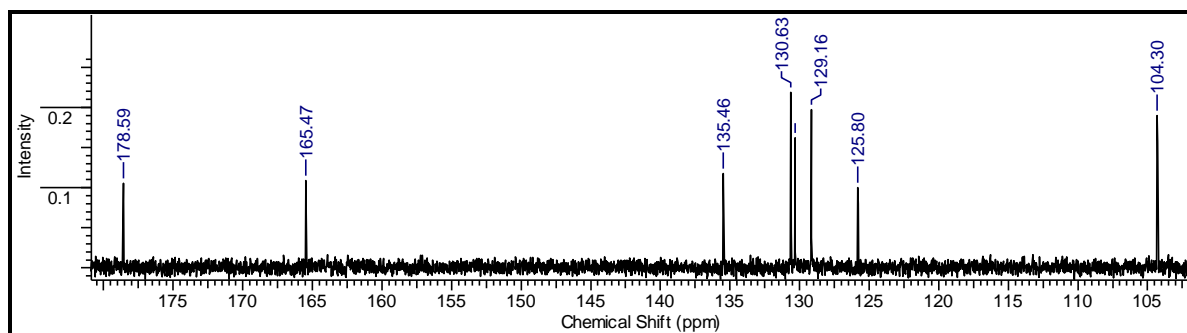
CG-EM (150 a 250 $^\circ\text{C}$, 15 $^\circ\text{C}/\text{min}$; t_R : 13,729 min): m/z (%)= 212 ($\text{M}+2$, 9), 212 ($\text{M}+1$, 11), 210 (M^+ , 92), 125 (5), 131 (87), 124 (19), 123 (100), 122 (38), 97 (13), 96 (63), 95 (17), 86 (11).



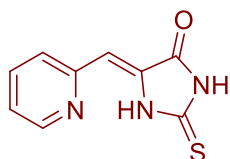
^1H -NMR (400,16 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 22 $^\circ\text{C}$) δ (ppm): 6,62 (s, 1H); 7,22 (dd; $J_1=5,25$ Hz; $J_2=3,83$ Hz, 1H); 7,81 (d,d; $J_1=5,25$ Hz; $J_2=0,81$ Hz, 1H), 7,86 (d,t; $J_1=3,83$ Hz; $J_2=0,81$ Hz, 1H), 10,97 ($\text{s}_{(\text{móvil})}$, 1H); 12,37 ($\text{s}_{(\text{móvil})}$, 1H).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 104,30; 125,80; 129,16; 130,33; 130,63; 135,46; 165,47; 178,59.

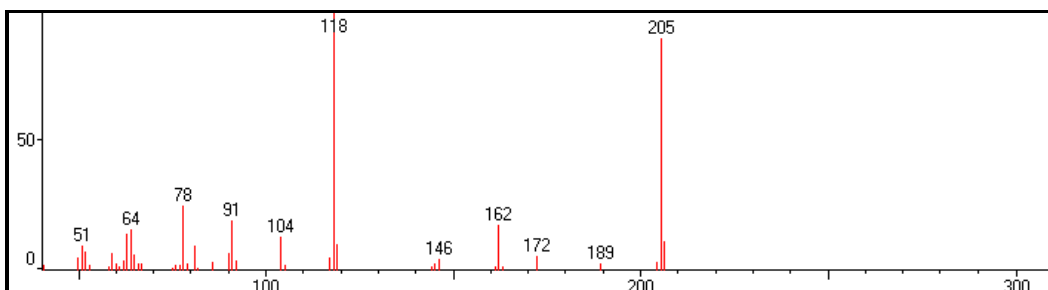


5-(piridin-2-il metilen) 2-tioximidazolidin-4-ona 13e

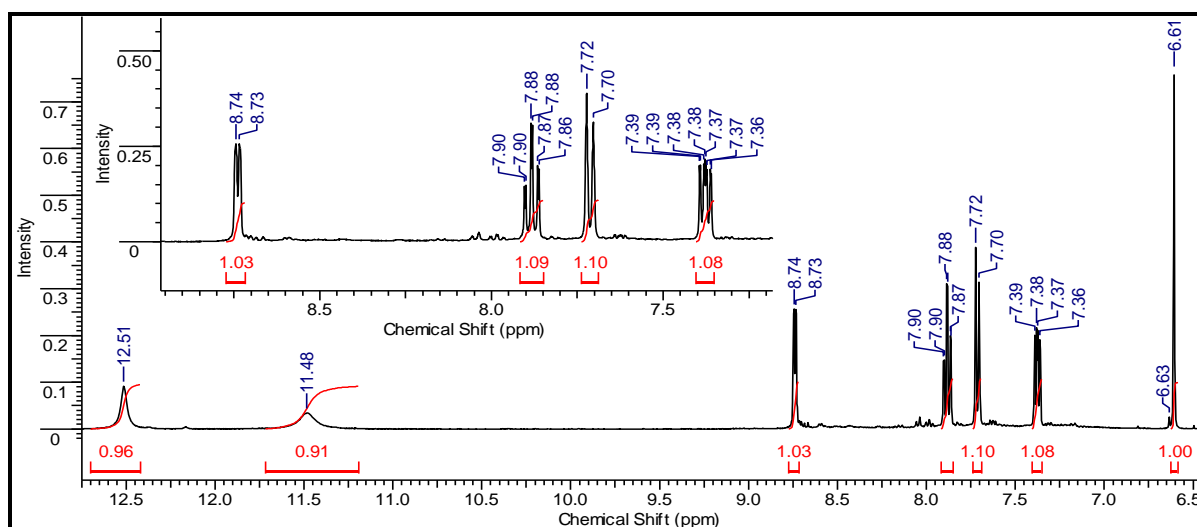


Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_3\text{OS}$
 m/z (M^+) calculada: 205,0310

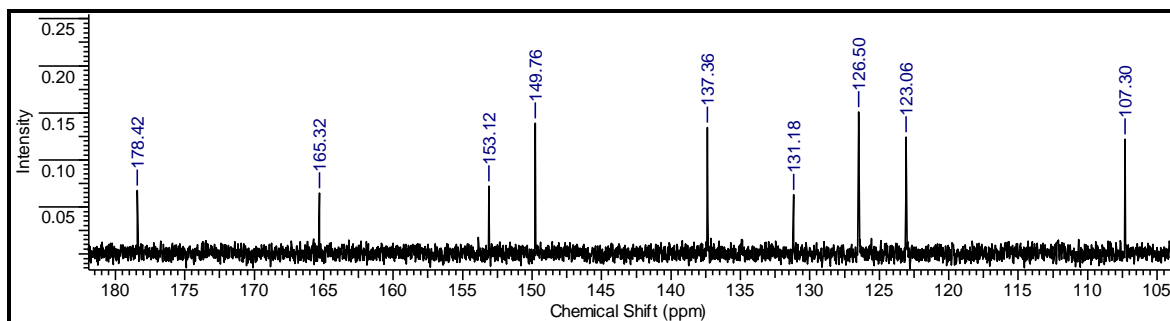
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 12,771 min): m/z (%) = 206 ($\text{M}+1$, 11), 205 (M^+ , 89), 172 (6), 162 (17), 146 (5), 119 (10), 118 (100), 104 (13), 91 (19), 81 (9), 78 (25), 64 (16), 63 (14), 51 (10).



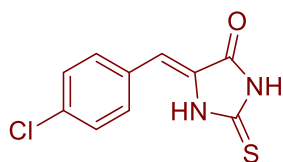
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 22°C) δ (ppm): 6.61 (s, 1H); 7.38 (dd,d; $J_1=7,72$ Hz; $J_2=4,82$ Hz, $J_3=1,07$ Hz; 1H); 7.71 (d; $J_1=7,72$ Hz, 1H), 7.88 (t,d; $J_1=7,72$ Hz; $J_2=1,80$ Hz, 1H), 8.74 (d; $J_1=4,82$ Hz, 1H), 11.48 (s(móvil), 1H); 12.51 (s(móvil), 1H).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 107,30; 123,06; 126,50; 131,18; 137,36; 149,76; 153,12; 165,32; 178,42.



5-(4-clorobenciliden) 2-tioimidazolidin-4-ona **13f**

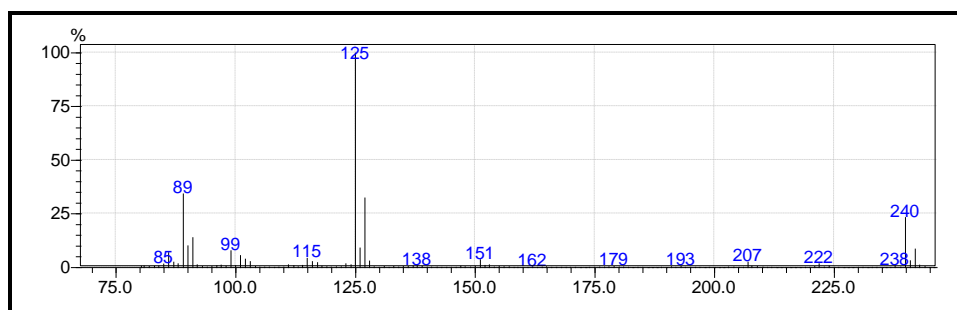


Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClN}_2\text{OS}$

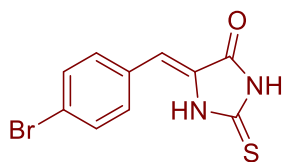
m/z (M^+ Cl^{35}) calculada: 237,9968

m/z (M^+ Cl^{37}) calculada: 239,9938

CG-EM (150 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 14,339 min): m/z (%) = 243 (1); 242 (9); 241 (3); 240 (23); 238 (1); 127 (33); 126 (9); 125 (100); 101 (6); 99 (8); 91 (44); 90 (10); 89 (34).



5-(4-bromobenciliden) 2-tioimidazolidin-4-ona **13g**

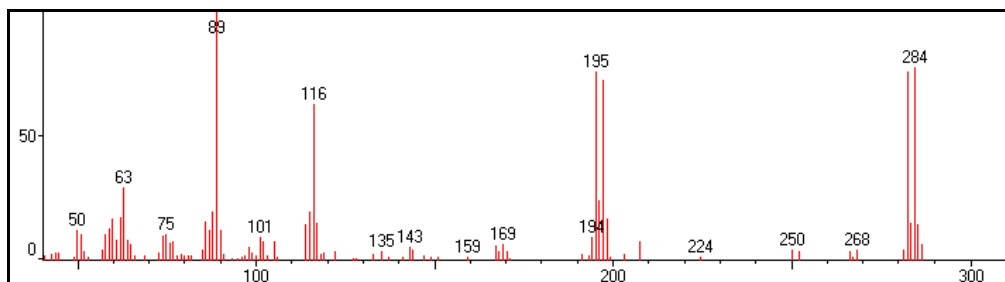


Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{OS}$

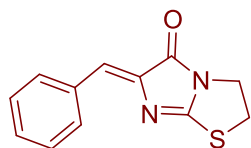
m/z (M^+ Br^{79}) calculada: 281,9462

m/z (M^+ Br^{81}) calculada: 283,9442

CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 13,042 min): m/z (%) = 284 (M^+ Br^{81} , 78), 282 (M^+ Br^{79} , 76), 198 (17), 197 (72), 196 (24), 195 (76), 194 (10), 117 (15), 116 (63), 115 (19), 114 (15), 101 (10), 90 (12), 89 (100), 88 (20), 87 (12), 86 (16), 75 (11), 74 (10), 63 (30), 62 (17), 60 (17), 59 (13), 58 (11), 51 (10), 50 (12).

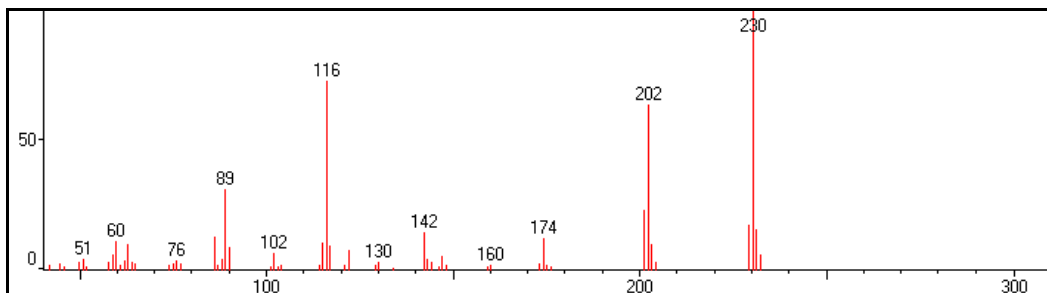


6-benciliden-2,3-dihidroimidazo[2,1-*b*]tiazol-5(6*H*)-ona 14a

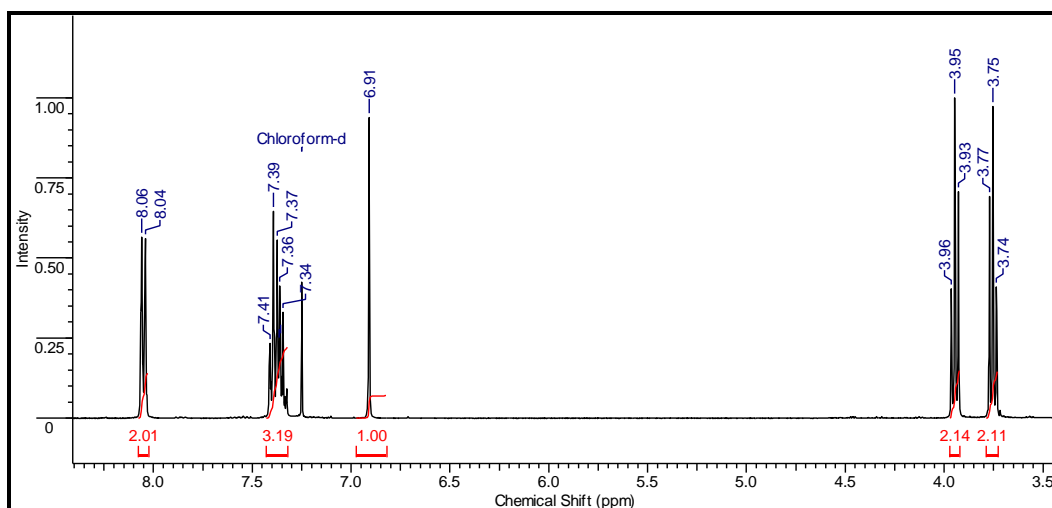


Fórmula molecular: C₁₂H₁₀N₂OS
m/z (M⁺) calculada: 230,0514

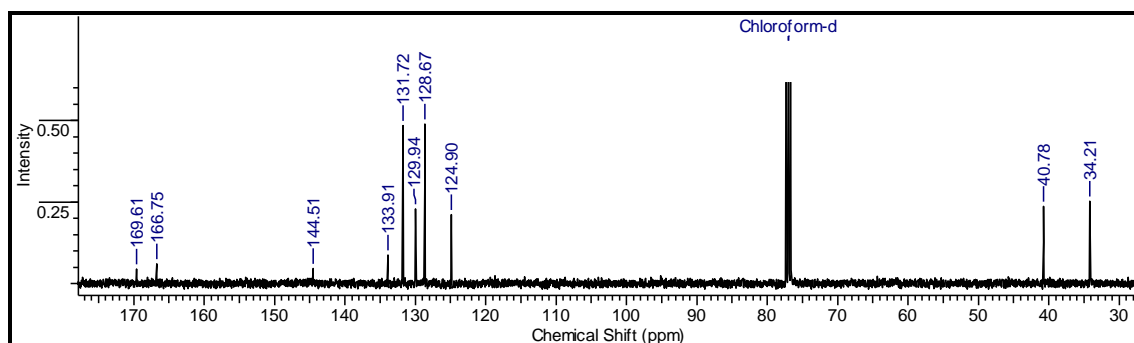
CG-EM (200 a 250 °C, 10 °C/min; t_R: 11,278 min): m/z (%) = 231 (M+1, 15), 230 (M⁺, 100), 229 (18), 203 (10), 202 (63), 201 (23), 174 (12), 142 (15), 116 (72), 115 (11), 90 (9), 89 (30), 86 (13), 63 (10), 60 (11).



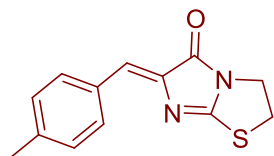
¹H-NMR (400,16 MHz, CDCl₃, 22°C) δ (ppm): 3,95 (t, J=7,07 Hz, 2H); 3,75 (t, J=7,07 Hz, 2H); 6,91 (s, 1H); 7,37 (m, 3H); 8,05 (d; J=8,50 Hz, 2H).



¹³C-NMR (100,56 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 34,21; 40,78; 124,90; 128,67 (2C); 129,94; 131,72 (2C); 133,51; 144,51; 166,75; 169,61.



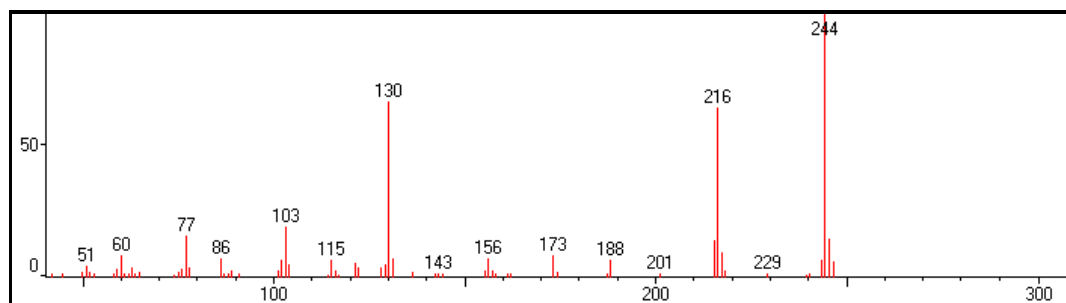
6-(4-metilbenciliden)-2,3-dihidroimidazo[2,1-*b*]tiazol-5(6*H*)-ona **14b**



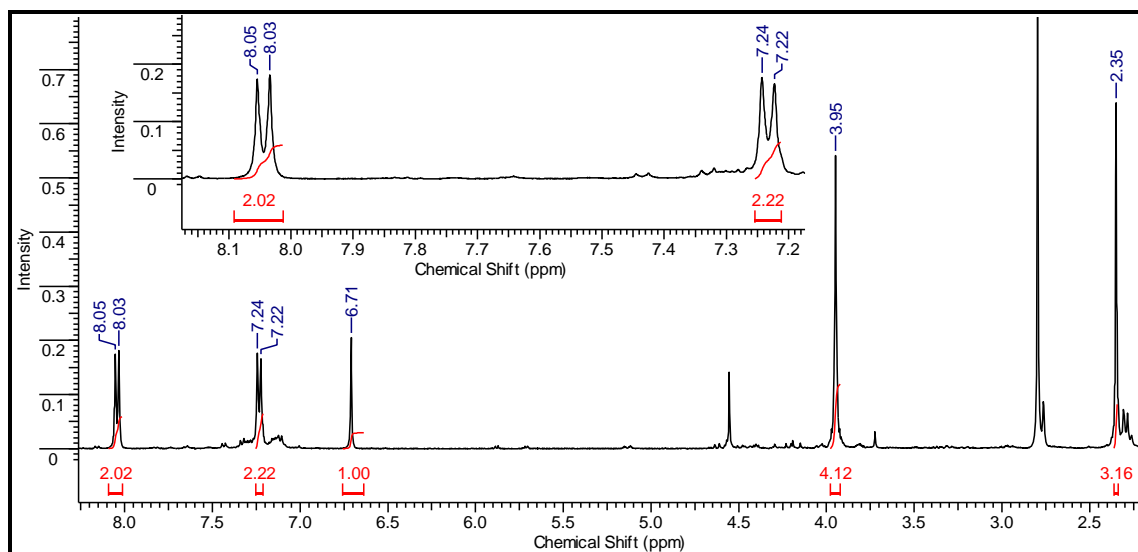
Fórmula molecular: C₁₃H₁₂N₂OS

m/z (M⁺) calculada: 244,0670

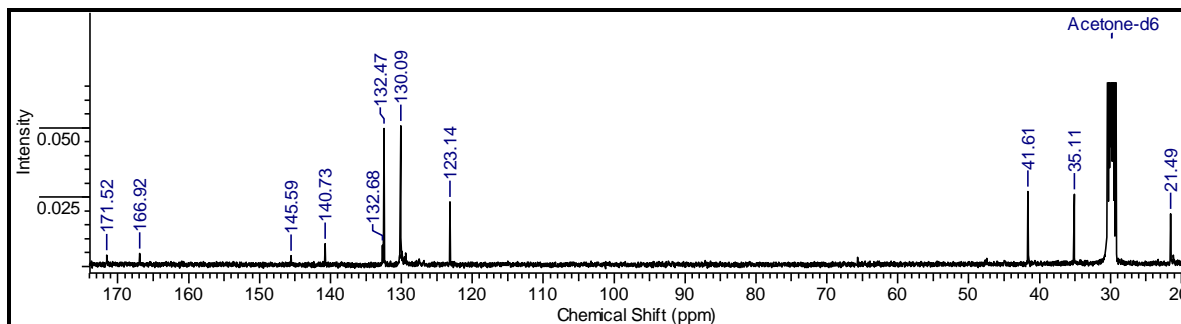
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R: 19,800 min): m/z (%) = 245 (M+1, 15), 244 (M⁺, 100), 243 (7), 217 (9), 216 (63), 215 (14), 173 (8), 130 (66), 115 (7), 115 (19), 103 (19), 86 (7), 77 (16), 60 (8).



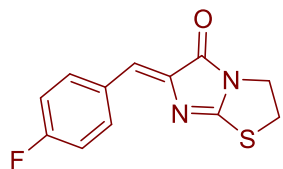
¹H-NMR (400,16 Mhz, acetona-*d*₆, 22°C) δ (ppm): 2,35 (s, 3H); 3,95 (s, 4H); 6,71 (s, 1H); 7,23 (d, *J*=8,10 Hz, 2H); 8,04 (d; *J*=8,10 Hz, 2H).



¹³C-NMR (100,56 MHz, acetona-*d*₆) δ (ppm): 21,48; 35,11; 41,61; 123,14; 130,09 (2C); 132,47 (2C); 132,68; 140,73; 145,59; 166,92; 171,52.

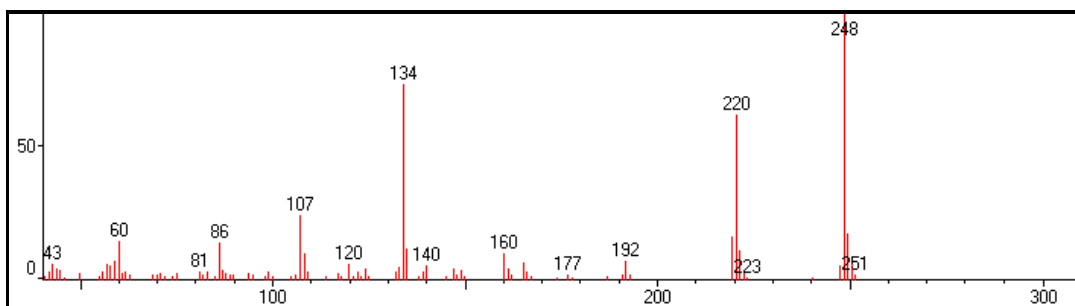


6-(4-fluorobenciliden)-2,3-dihidroimidazo[2,1-*b*]tiazol-5(6*H*)-ona 14c

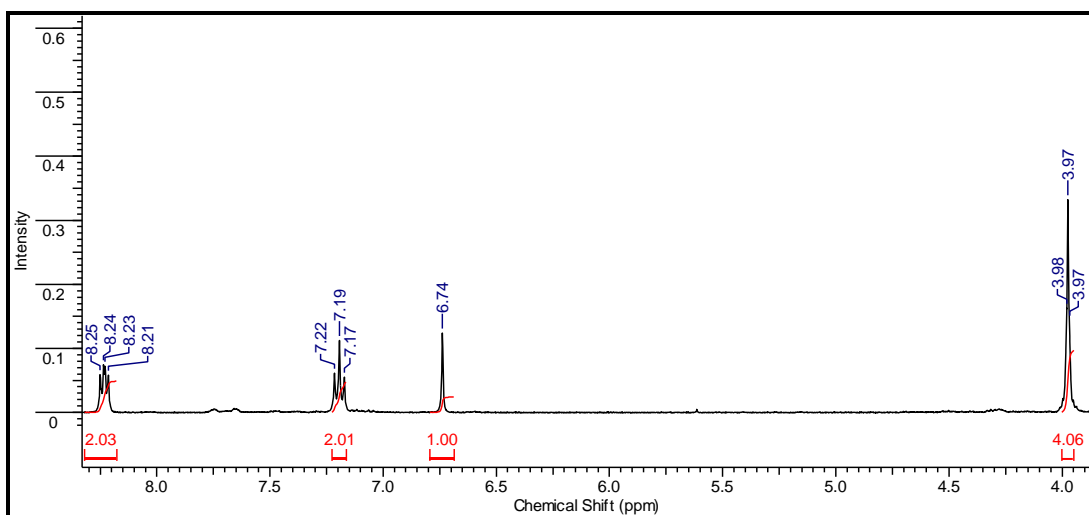


Fórmula molecular: C₁₂H₉FN₂OS
 m/z (M⁺) calculada: 248,0420

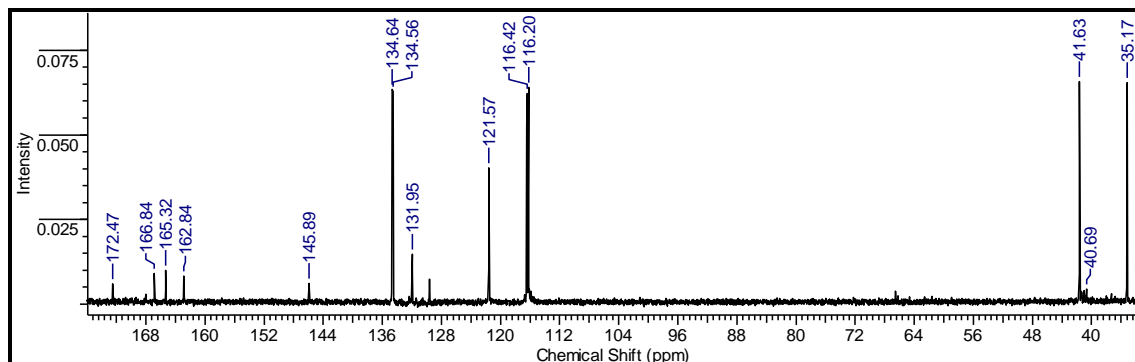
CG-EM (150 a 250 °C, 15 °C/min; t_R: 14,315 min): m/z (%) = 250 (M+2, 7), 249 (M+1, 17), 248 (M⁺, 100), 221 (11), 220 (62), 219 (16), 165 (6), 160 (10), 140 (6), 135 (11), 134 (73), 108 (10), 86 (7), 107 (24), 86 (14), 60 (16), 43 (6).



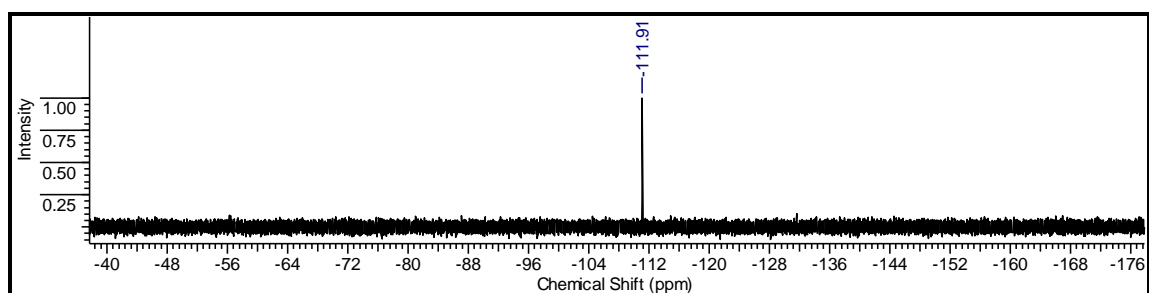
¹H-NMR (400,16 MHz, acetona-*d*₆, 22°C) δ (ppm): 3,75 (s, 4H); 6,74 (s, 1H); 7,19 (t, *J*₁=8,86 Hz, 2H); 8,24 (dd, *J*₁=8,86 Hz, *J*₂=5,77 Hz, 2H).



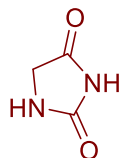
¹³C-NMR (100,56 MHz, acetona-*d*₆) δ (ppm): 35,17; 41,63; 164,08 (*J*₂^{C-F}=21,88 Hz, 2C); 121,57; 131,99 (*J*₄^{C-F}=3,70 Hz); 134,47 (*J*₃^{C-F}=8,42 Hz, 2C); 145,89; 164,08 (*J*₁^{C-F}=249,76 Hz, 2C); 166,84; 172,47.



^{19}F -NMR (376,53 MHz; acetona- d_6) δ (ppm): -111,91.



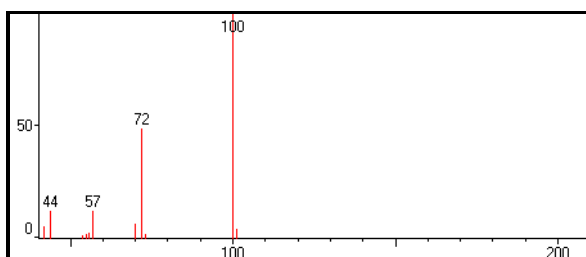
hidantoína 15



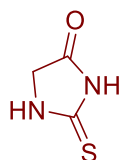
Fórmula molecular: $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$

m/z (M^+) calculada: 100,0273

CG-EM (200 a 250 °C, 10 °C/min; t_R : 8,084 min): m/z (%) = 101 ($\text{M}+1$, 4), 100 (M^+ , 100), 72 (48), 70 (7), 57 (12), 44 (23), 43 (18), 42 (7).



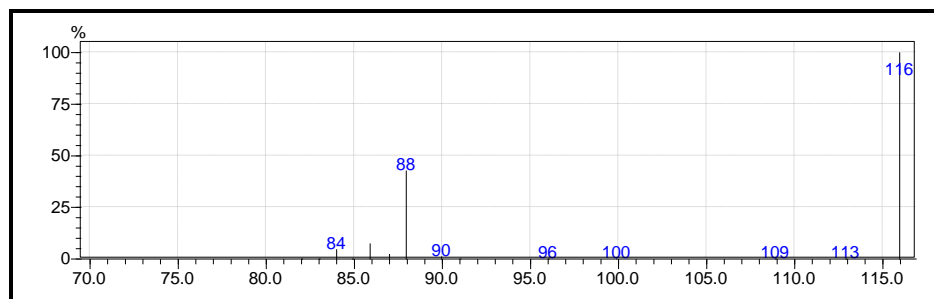
2-tiohidantoína 16



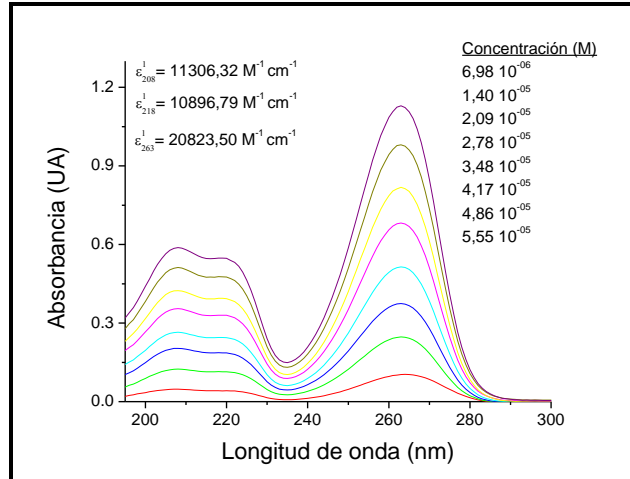
Fórmula molecular: $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{OS}$

m/z (M^+) calculada: 116,0044

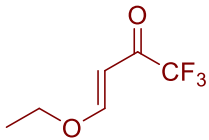
CG-EM (150 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 6,708 min): m/z (%) = 116 (M^+ , 100), 88 (43), 86 (7), 84 (5).



UV-Vis (ACN): $\epsilon_{208} = 11,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{218} = 10,90 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{263} = 20,82 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

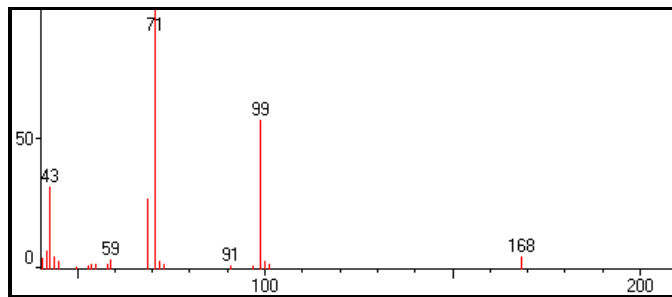


E-4-etoxi-1,1,1-trifluorobut-3-en-2-ona 31

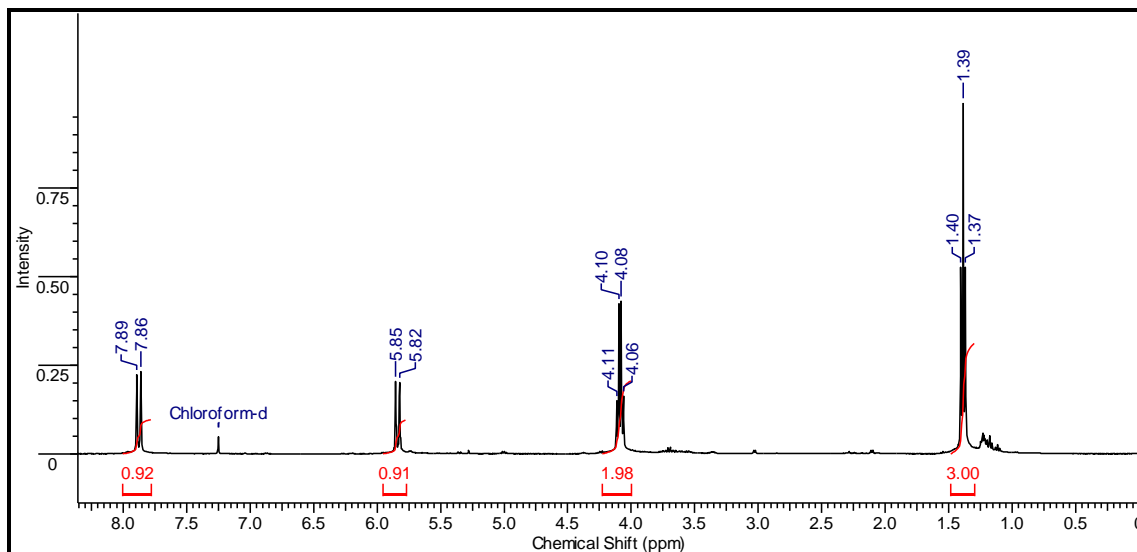


Fórmula molecular: $\text{C}_6\text{H}_7\text{F}_3\text{O}_2$
 m/z (M^+) calculada: 168,0398

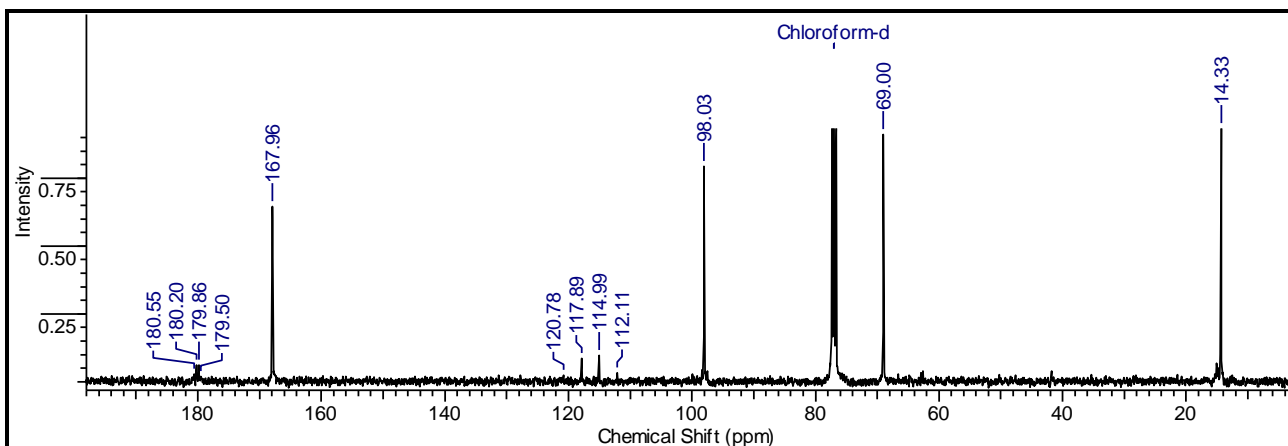
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 3,604 min): m/z (%) = 168 (M^+ , 5), 99 (57), 71 (100), 69 (27), 43 (25).



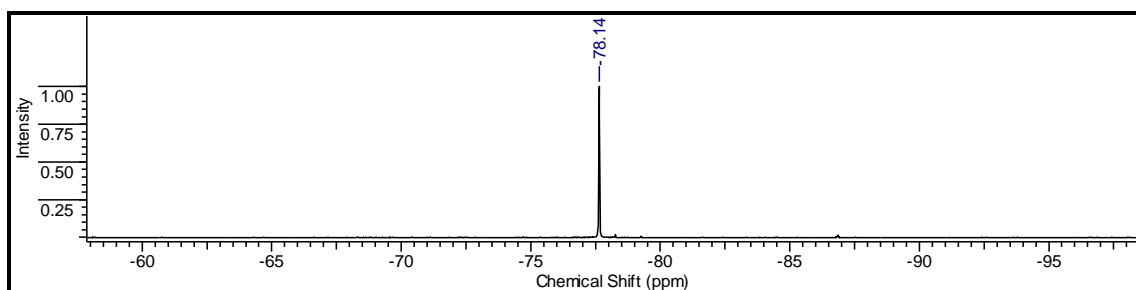
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, CDCl_3 , 22°C) δ (ppm): 1,41 (t, $J=7,13$ Hz, 3H); 4,11 (c, $J=7,13$ Hz, 2H); 5,86 (d, $J=12,35$ Hz, 2H); 7,90 (d, $J=12,35$ Hz, 2H).



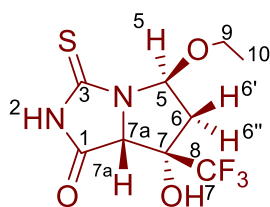
^{13}C -NMR (100,56 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14,33; 89,00; 98,03 (2C); 116,44 (J_1^{C-F} =290,82 Hz); 167,96; 180,03 (J_2^{C-F} =35,00 Hz).



^{19}F -NMR (376,53 MHz; CDCl_3) δ (ppm): -78,14.

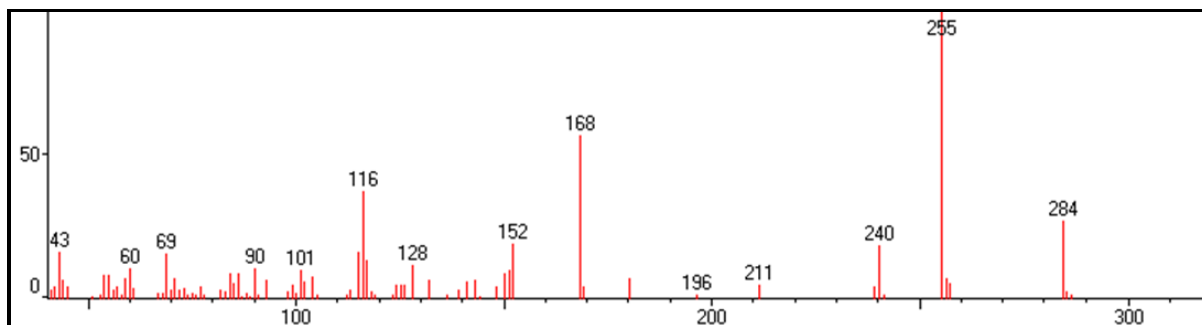


(5*S*,7*S*,7*a*R)-5-etoxi-7-hidroxi-3-tioxo-7-(trifluorometil) hexahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*d*]imidazol-1-ona **40**

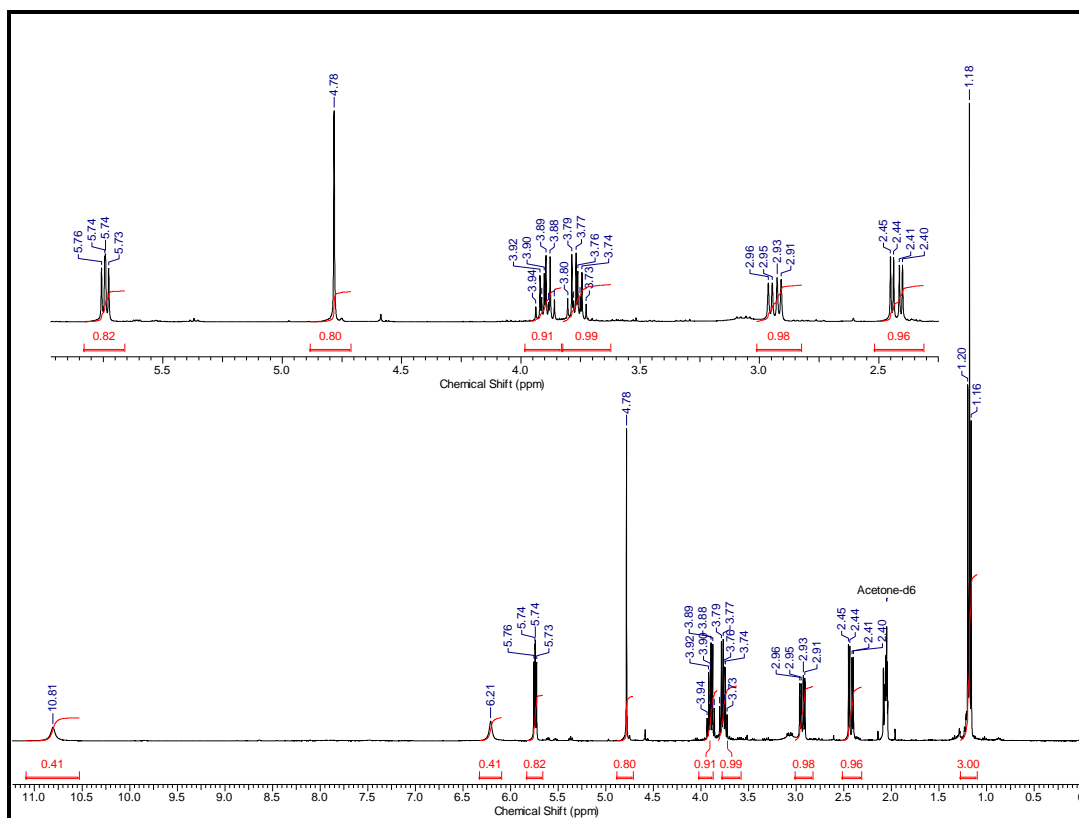


Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$
 m/z (M + H) medida (HR-MS): 285,05048
 m/z (M + H) calculada: 285,05152

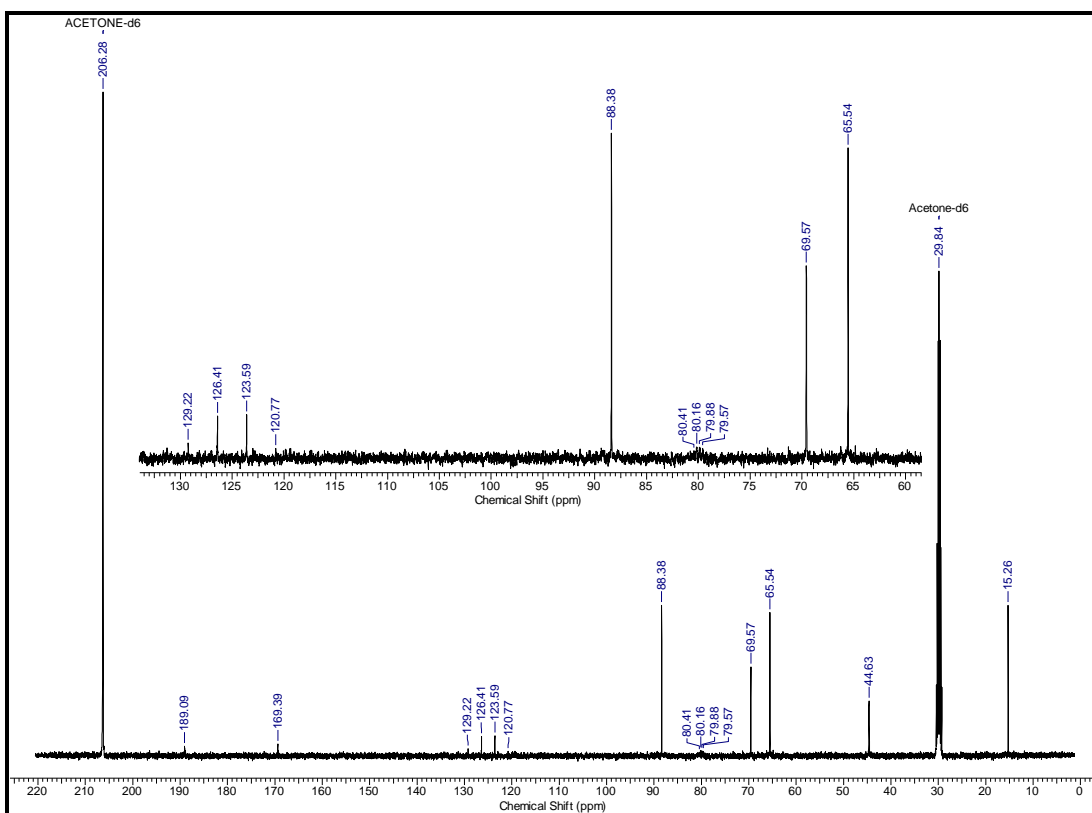
CG-EM (100 a 250 $^\circ\text{C}$, 15 $^\circ\text{C}/\text{min}$; t_R : 7,48 min): m/z (%) = 284 (M^+ , 27), 255 (100), 211 (5), 196 (2), 168 (56), 152 (19), 128 (11), 116 (37), 101 (10), 90 (10.5), 60 (12).



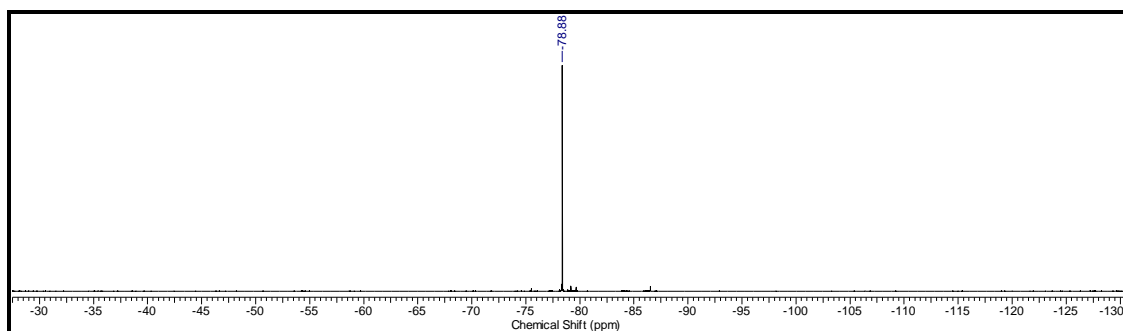
$^1\text{H-NMR}$ (400,16 MHz, acetona- d_6 , 2 2°C) δ (ppm): 1.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H^{10}); 2.43 (dd, $J_{1\text{H}6'-\text{H}6''} = 15.2$ Hz, $J_{2\text{H}6'-\text{H}5} = 5.5$ Hz, $1\text{H}^{6'}$); 2.94 (dd, $J_{1\text{H}6''-\text{H}6'} = 15.2$ Hz, $J_{2\text{H}6''-\text{H}5} = 6.8$ Hz, $1\text{H}^{6''}$); 3.77 (m, 1H^9); 3.90 (m, 1H^9); 4.78 (s, 1H^{7a}); 5.74 (dd, $J_{1\text{H}5-\text{H}6''} = 6.8$ Hz, $J_{2\text{H}5-\text{H}6'} = 5.5$ Hz, 1H^5); 6.21 (s, 1H^2); 10.81 (s, 1H^7).



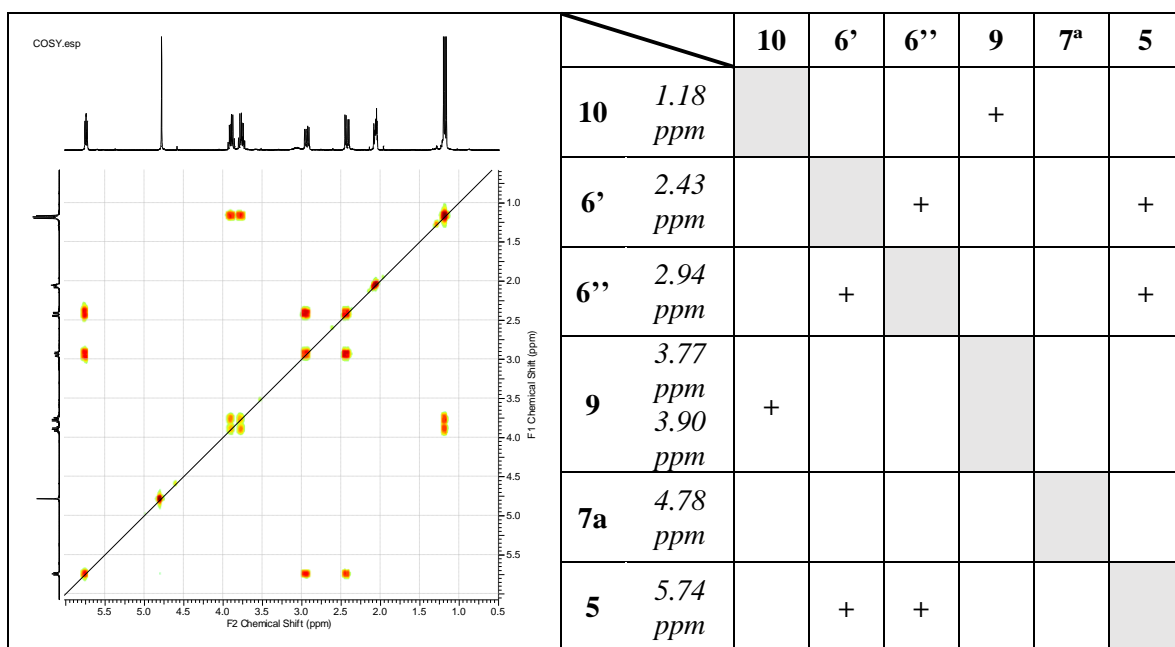
$^{13}\text{C-NMR}$ (100,56 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 16.02 (C^{10}), 45.39 (C^6), 66.30 (C^9), 70.33 (C^{7a}), 80.77 ($J_{\text{C}7-\text{C}8} = 27.9$, C^7), 89.14 (C^5), 125.76 ($J_{\text{CF}3} = 283,4$ Hz, C^8), 170.15 (C^1), 189.85 (C^3).



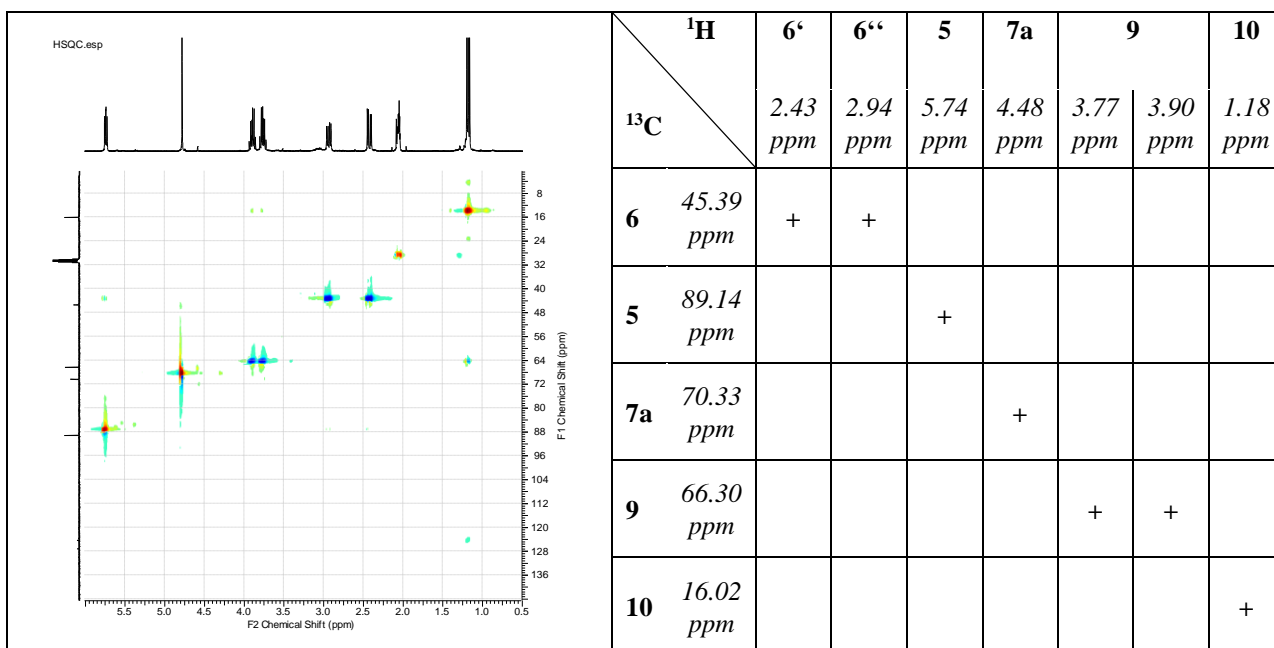
^{19}F -NMR (376,53 MHz; acetona- d_6) δ (ppm): -78.88.



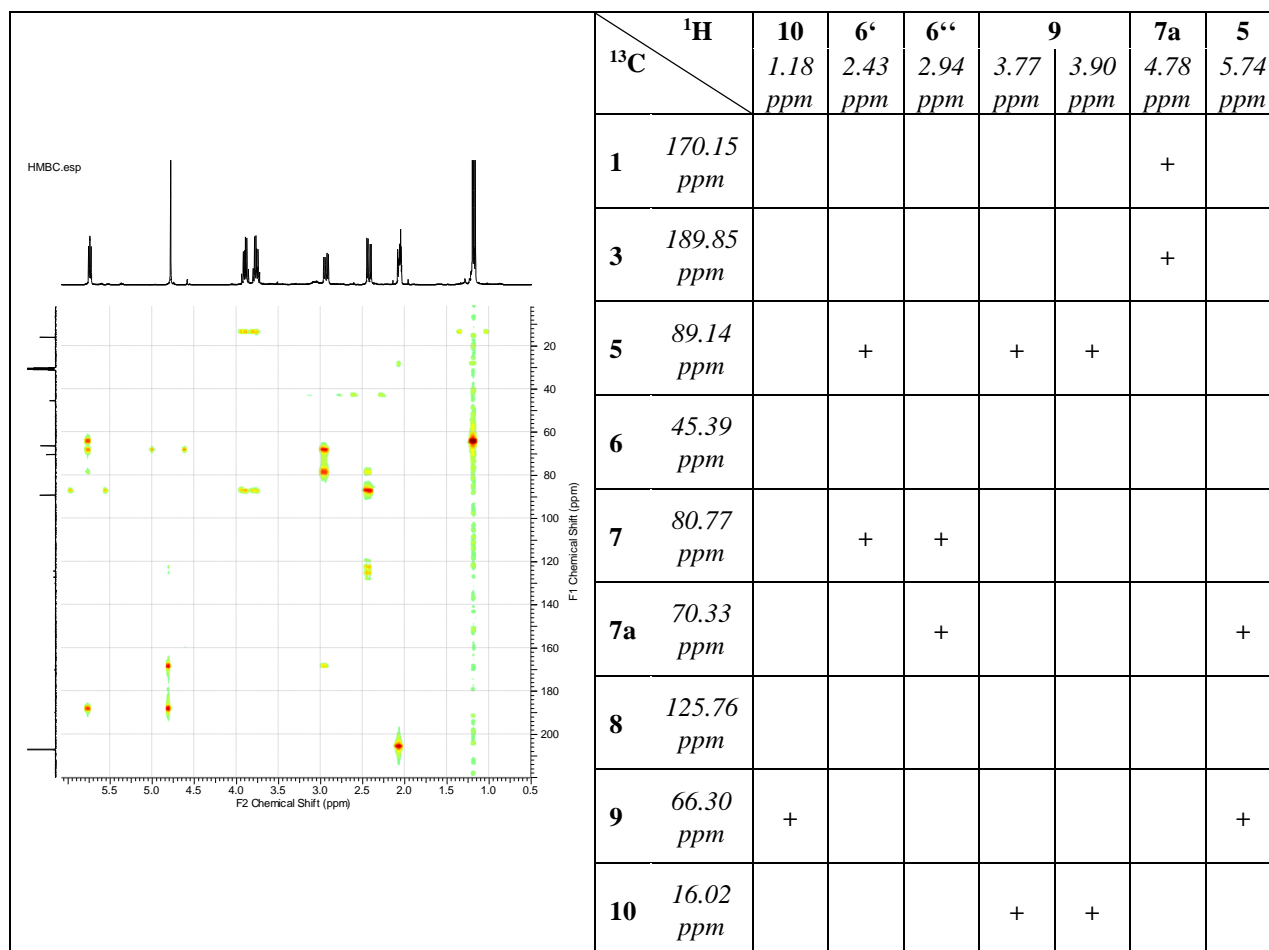
COSY (400,16; 400,16 MHz; acetona- d_6)



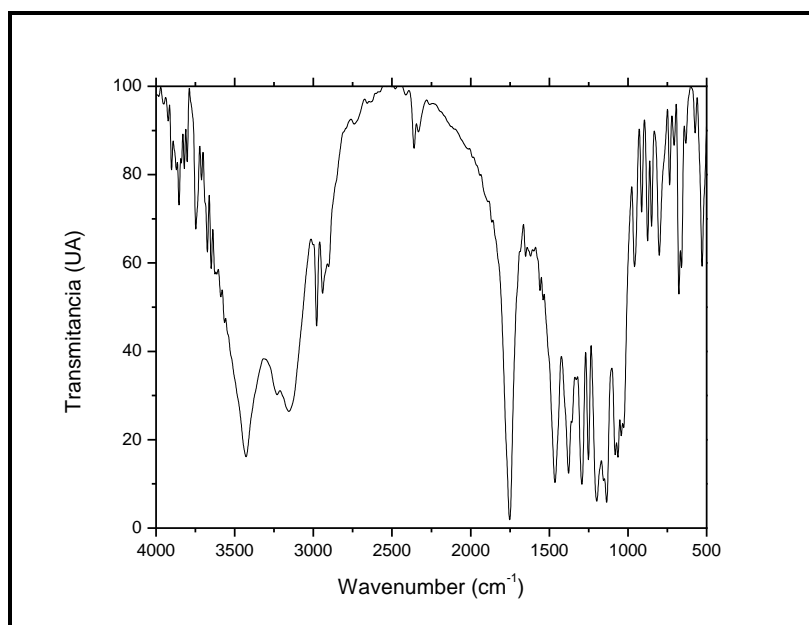
HSQC (400,16; 100,62 MHz; acetona- d_6)



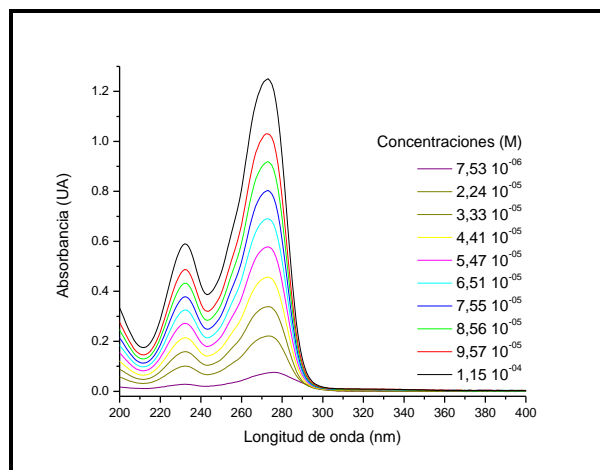
HMBC (400,16; 100,62 MHz; acetona-*d*₆)



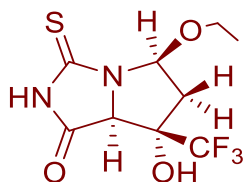
IR (KBr), ν (cm⁻¹): 3428; 3237; 3154; 2979; 2364; 1752; 1464; 1293; 1252; 1136.



UV-Vis (ACN): $\epsilon_{232} = (5.37 \pm 0.02) 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{273} = (10.93 \pm 0.08) 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



(5*S*,7*S*,7*aS*)-5-etoxi-7-hidroxi-3-tioxo-7-(trifluorometil) hexahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*d*]imidazol-1-ona **40'**

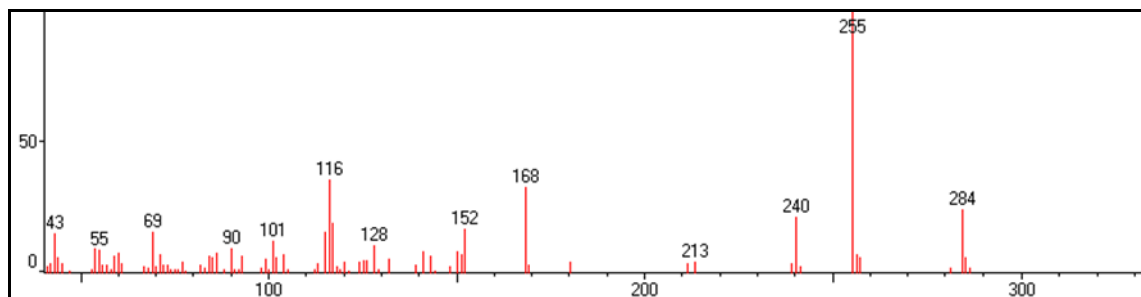


Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

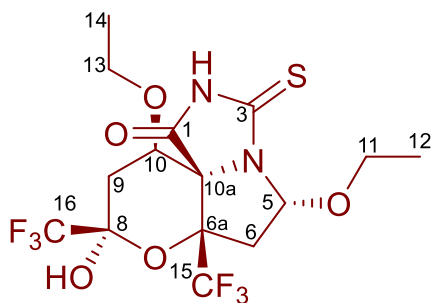
Medida m/z (M + H): 285.05108

Calculada m/z (M + H): 285.05152

CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 8,06 min) m/z (%) = 284 (M^+ , 24), 255 (100), 240 (22), 168 (32), 152 (17), 128 (11), 116 (35), 101 (12), 69 (14), 43 (14).



(5*S*,6*aR*,8*S*,10*S*,10*aR*)-5,10-dietoxi-8-hidroxi-3-tioxo-6*a*,8-bis(trifluorometil) hexahidro-1*H*,5*H*,8*H*-pirano[3',2':2,3]pirrolo[1,2-*d*]imidazol-1-ona **41**

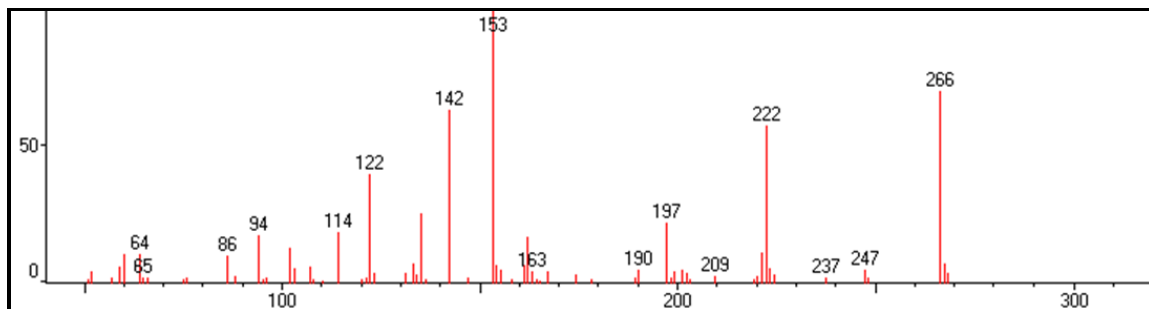


Fórmula molecular: $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$

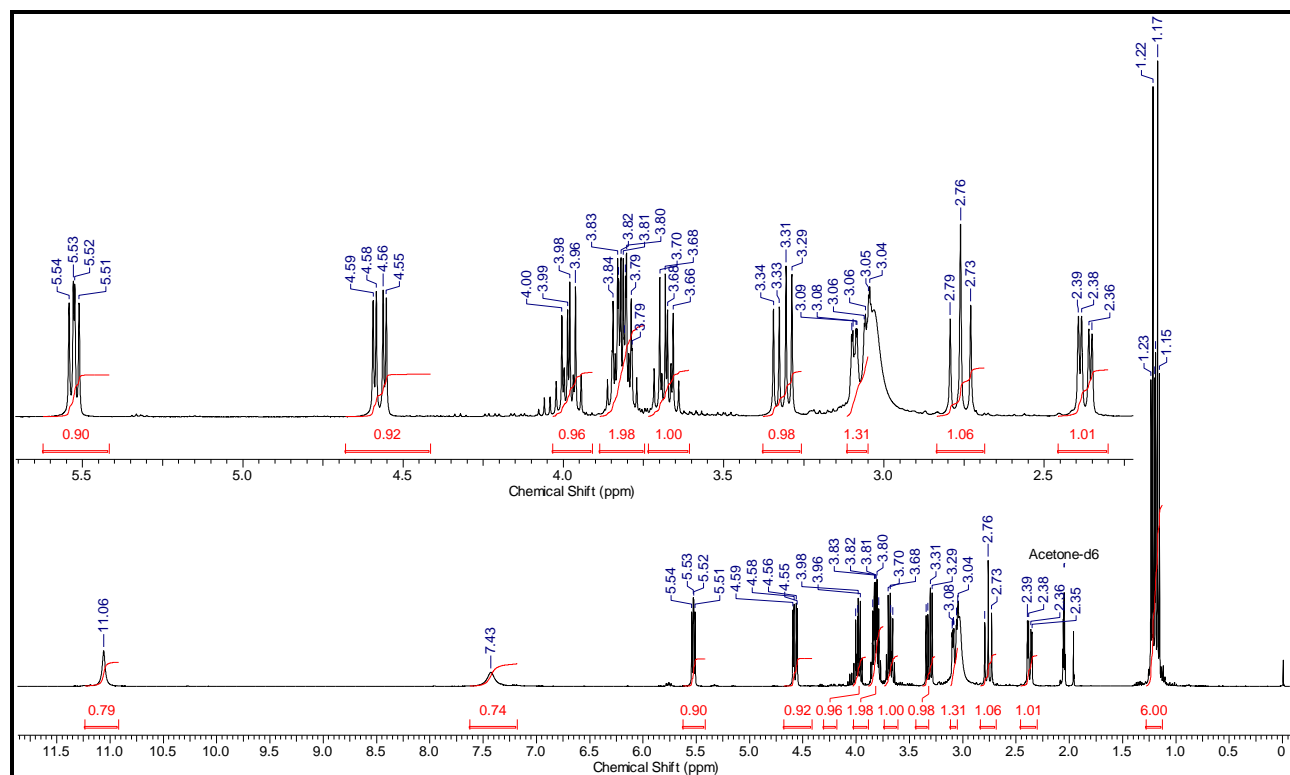
m/z (M + H) medido: 453,09095

m/z (M + H) calculada: 453,09134

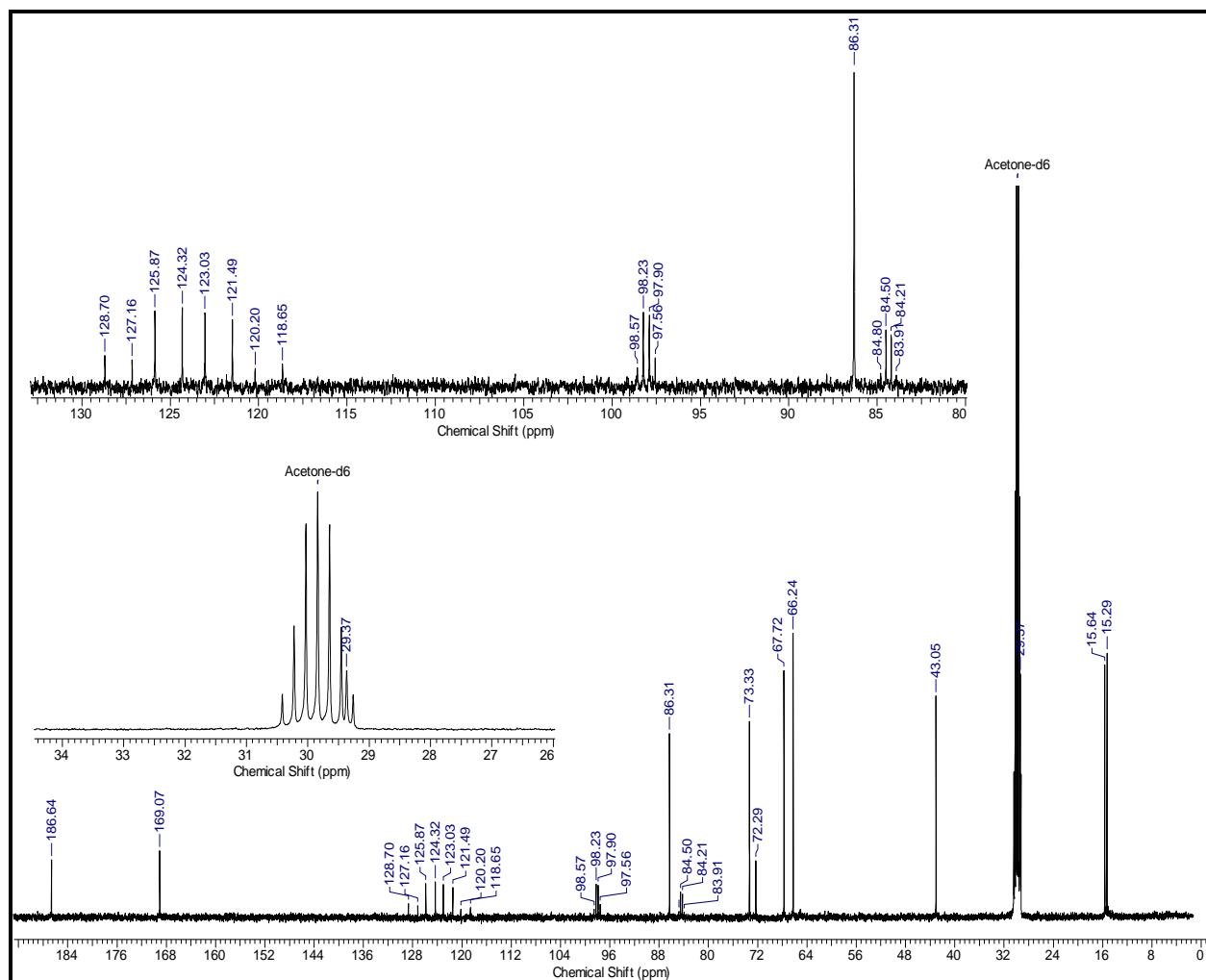
CG-EM (100 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 7.73 min) m/z (%) = 266 (M^+ -186, 67), 222(55), 197(21), 162(16), 153(100), 142(61), 135(25), 122(40), 102(19), 86(19), 60(17).



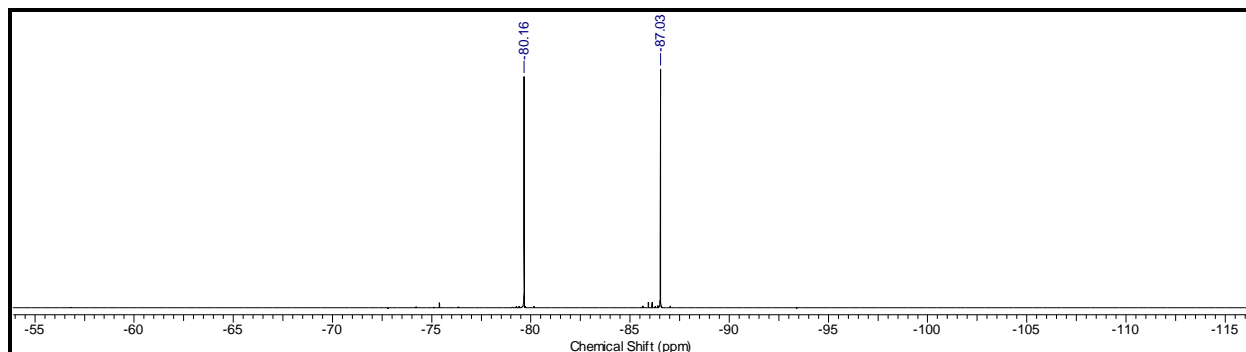
$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, acetone- d_6 , 22°C) δ (ppm): 1.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H^{14}); 1.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H^{12}); 2.37 (dd, $J_{\text{H}9'-\text{H}9''} = 12.95$ Hz, $J_{\text{H}9'-\text{H}10} = 3.99$ Hz, $1\text{H}^{9'}$); 2.76 (dd, $J_{\text{H}9'-\text{H}9''} = 12.95$ Hz, $J_{\text{H}9'-\text{H}10} = 12.72$ Hz, 1H^9); 3.07 (dd, $J_{\text{H}6'-\text{H}6''} = 15.49$ Hz, $J_{\text{H}6'-\text{H}5} = 5.45$ Hz, 1H^6); 3.32 (dd, $J_{\text{H}6'-\text{H}6''} = 15.49$ Hz, $J_{\text{H}6'-\text{H}5} = 7.28$ Hz, $1\text{H}^{6''}$); 3.74 (m, 2H^{13}); 3.90 (m, 2H^{11}); 4.57 (dd, $J_{\text{H}10-\text{H}9'} = 12.72$ Hz, $J_{\text{H}10-\text{H}9''} = 3.99$ Hz, 1H^9); 5.52 (dd, $J_{\text{H}5-\text{H}6'} = 7.28$ Hz, $J_{\text{H}5-\text{H}6} = 5.45$ Hz, 1H^5); 7.43 (s, 1H^2); 11.06 (s, 1H^8).



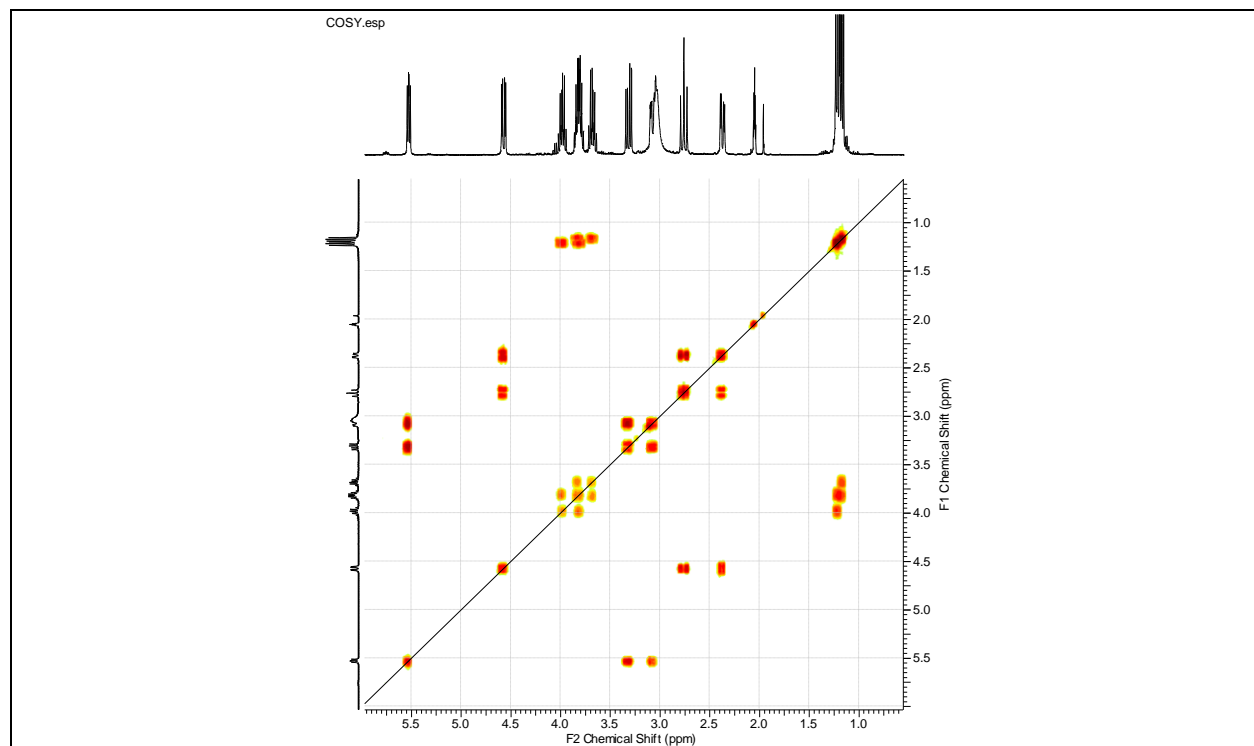
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.56 MHz, acetone- d_6) δ (ppm): 15.29 (C^{12}), 15.64 (C^{14}), 29.37 (C^9), 43.05 (C^6), 66.24 (C^{11}), 67.72 (C^{13}), 72.29 (C^{10a}), 73.33 (C^{10}), 84.36 ($J_{\text{C}^{6a}\text{-CF}_3} = 29.8$ Hz, C^{6a}), 86.31 (C^5), 98.07 ($J_{\text{C}^8\text{-CF}_3} = 33.9$, C^8), 122.90 ($J_{\text{CF}_3} = 285.5$ Hz, C^{16}), 124.45 ($J_{\text{CF}_3}=285.2$ Hz, C^{15}), 169.07 (C^1), 186.64 (C^3).



$^{19}\text{F-NMR}$ (376.53 MHz, acetone- d_6) δ (ppm) = -80.16 ($^{15}\text{CF}_3$), -87.03 ($^{16}\text{CF}_3$).

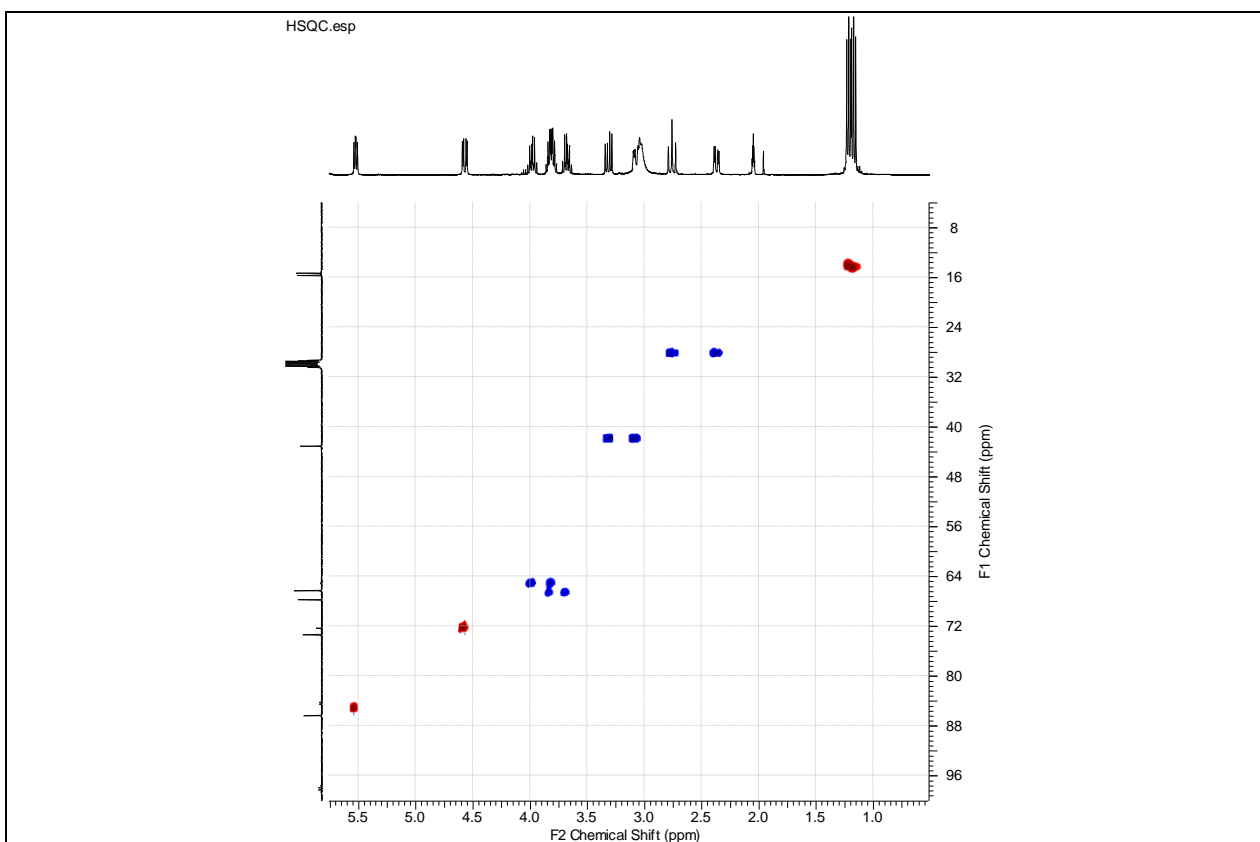


COSY (400.16, 400.16 MHz, acetone-*d*₆)



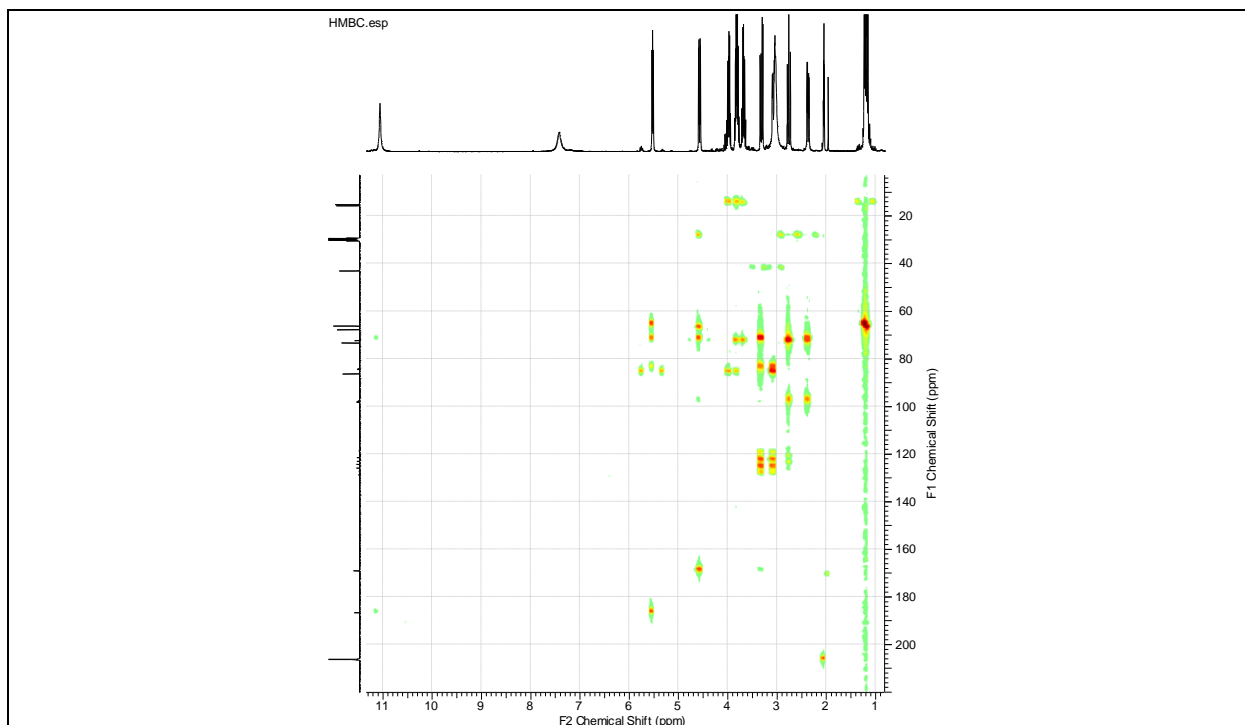
¹ H	14	12	9'	9''	6'	6''	13	11	10	5	2	8
14 1.17 ppm							+					
12 1.22 ppm								+				
9' 2.37 ppm									+			
9'' 2.76 ppm									+			
6' 3.07 ppm										+		
6'' 3.32 ppm										+		
13 3.74 ppm	+											
11 3.90 ppm		+										
10 4.57 ppm			+	+								
5 5.52 ppm					+	+						
2 7.43 ppm												
8 11.06 ppm												

HSQC (400.16, 100.62 MHz, acetone-*d*₆)



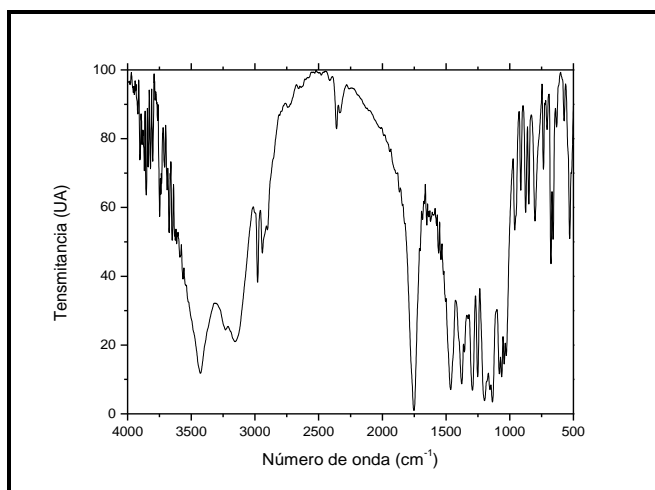
¹³ C \ ¹ H	14 1.17 ppm	12 1.22 ppm	9' 2.37 ppm	9'' 2.76 ppm	6' 3.07 ppm	6'' 3.32 ppm	13 3.74 ppm	11 3.90 ppm	10 4.57 ppm	5 5.52 ppm
12 15.29 ppm		+								
14 15.64 ppm	+									
9 29.37 ppm			+	+						
6 43.05 ppm					+	+				
11 66.24 ppm								+		
13 67.72 ppm							+			
10 73.33 ppm									+	
5 86.31 ppm										+

HMBC (400.16, 100.62 MHz, acetona-*d*₆)

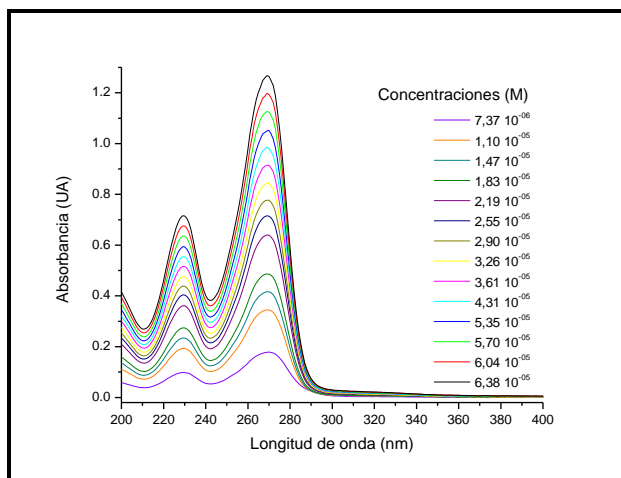


¹ H \ ¹³ C	14 1.17 <i>ppm</i>	12 1.22 <i>ppm</i>	9' 2.37 <i>ppm</i>	9'' 2.76 <i>ppm</i>	6' 3.07 <i>ppm</i>	6'' 3.32 <i>ppm</i>	13 3.74 <i>ppm</i>	11 3.90 <i>ppm</i>	10 4.57 <i>ppm</i>	5 5.52 <i>ppm</i>	2 7.43 <i>ppm</i>	8 11.06 <i>ppm</i>
12 15.29 <i>ppm</i>								+				
14 15.64 <i>ppm</i>							+					
9 29.37 <i>ppm</i>									+			
6 43.05 <i>ppm</i>												
11 66.24 <i>ppm</i>		+								+		
13 67.72 <i>ppm</i>	+								+			
10a 72.29 <i>ppm</i>			+	+		+			+	+		+ _w
10 73.33 <i>ppm</i>							+					
6a 84.36 <i>ppm</i>					+	+				+		
5 86.31 <i>ppm</i>								+				
8 98.07 <i>ppm</i>			+	+								
16 122.90 <i>ppm</i>												
15 124.45 <i>ppm</i>					+	+						
1 169.07 <i>ppm</i>									+			+ _w
3 186.64 <i>ppm</i>										+		

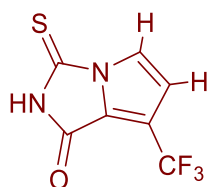
IR (KBr disc), ν (cm^{-1}): 3432; 3208; 2981; 2941; 1754; 1461; 1378; 1295; 1248.



UV-Vis (ACN): $\epsilon_{232} = (11.35 \pm 0.06) 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{273} = (20.4 \pm 0.2) 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



3-tioxo-7-(trifluorometil)-2,3-dihidro-1H-pirrolo[1,2-d]imidazol-1-ona **44**

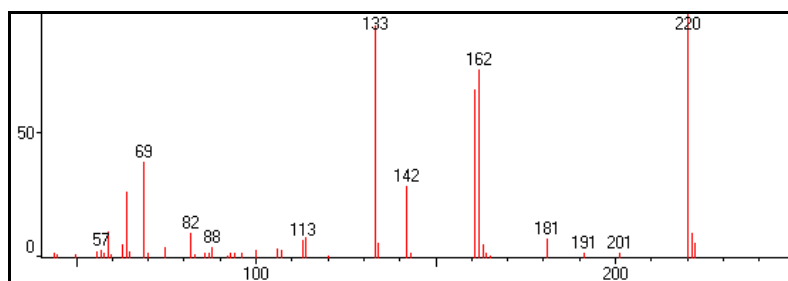


Fórmula molecular: $\text{C}_7\text{H}_3\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$

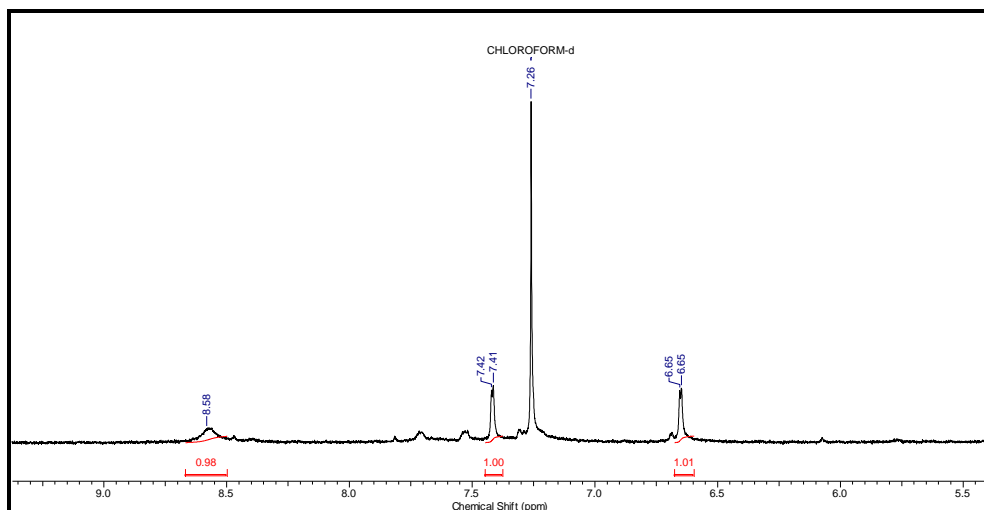
Medido m/z ($\text{M} + \text{H}$): 219.9915

Calculado m/z ($\text{M} + \text{H}$): 219.9918

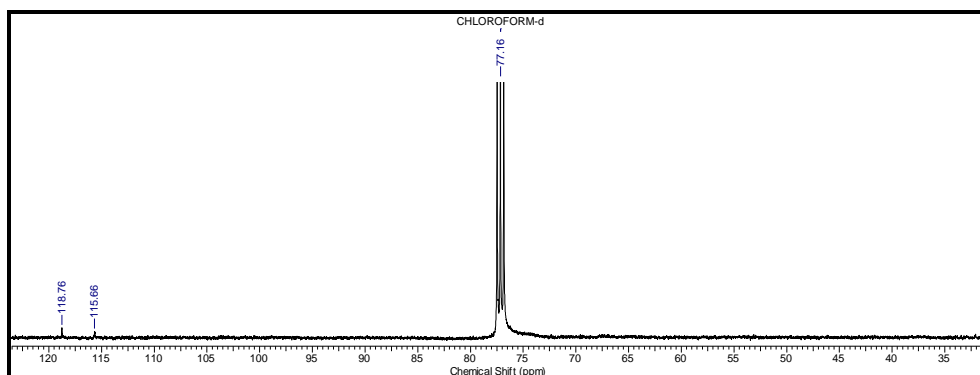
CG-EM (100 a 250 $^\circ\text{C}$, 15 $^\circ\text{C}/\text{min}$; t_{R} : 9,02 min) m/z (%) = 220 (M^+ , 100), 162 (75), 161 (68), 142 (28), 133 (93), 69 (38), 64 (26).



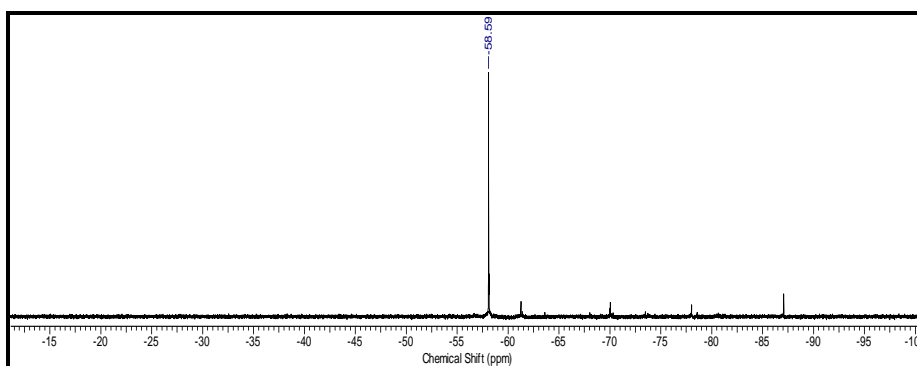
$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, cloroformo- d_3 , 27°C) δ (ppm): 6.65 (d, $J = 2.77$ Hz, 1H); 7.42 (d, $J = 2.77$ Hz, 1H); 8.58 (s, 1H).



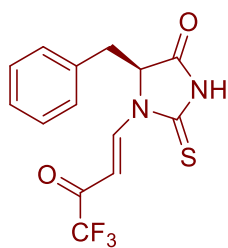
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.56 MHz, chloroform- d_3 , 27°C) δ (ppm): 115.66 (C), 118.76 (C).



$^{19}\text{F-NMR}$ (376.53 MHz, chloroform- d_3 , 27°C) δ (ppm) = -58.59.

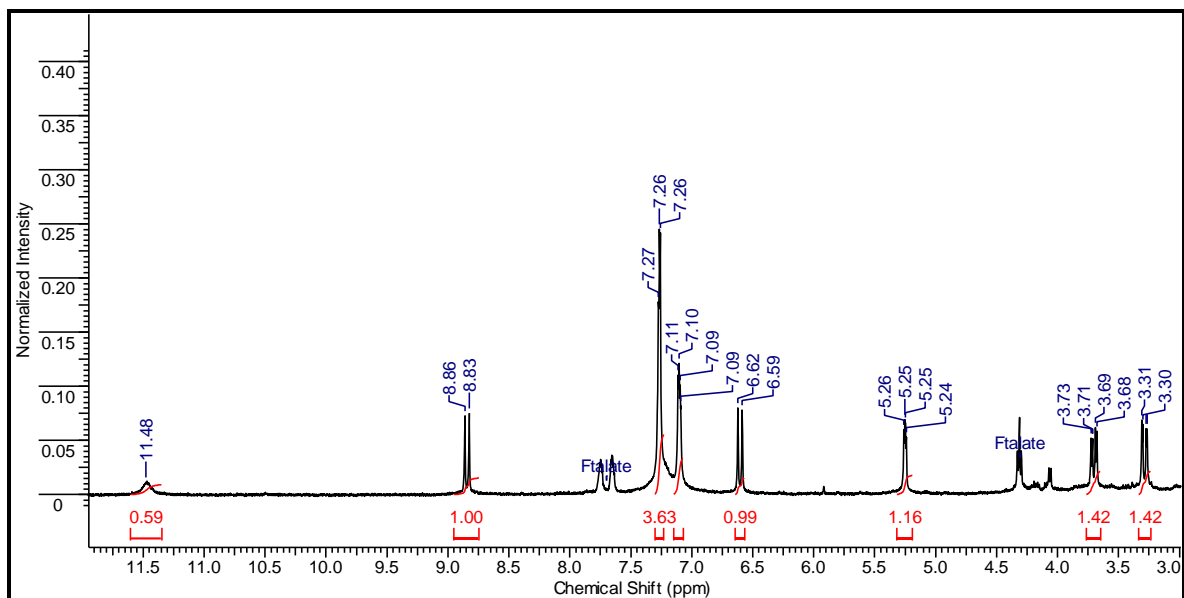


(*S,E*)-5-bencil-2-tioxo-1-(4,4,4-trifluoro-3-oxobut-1-en-1-il)imidazolidin-4-ona **59**

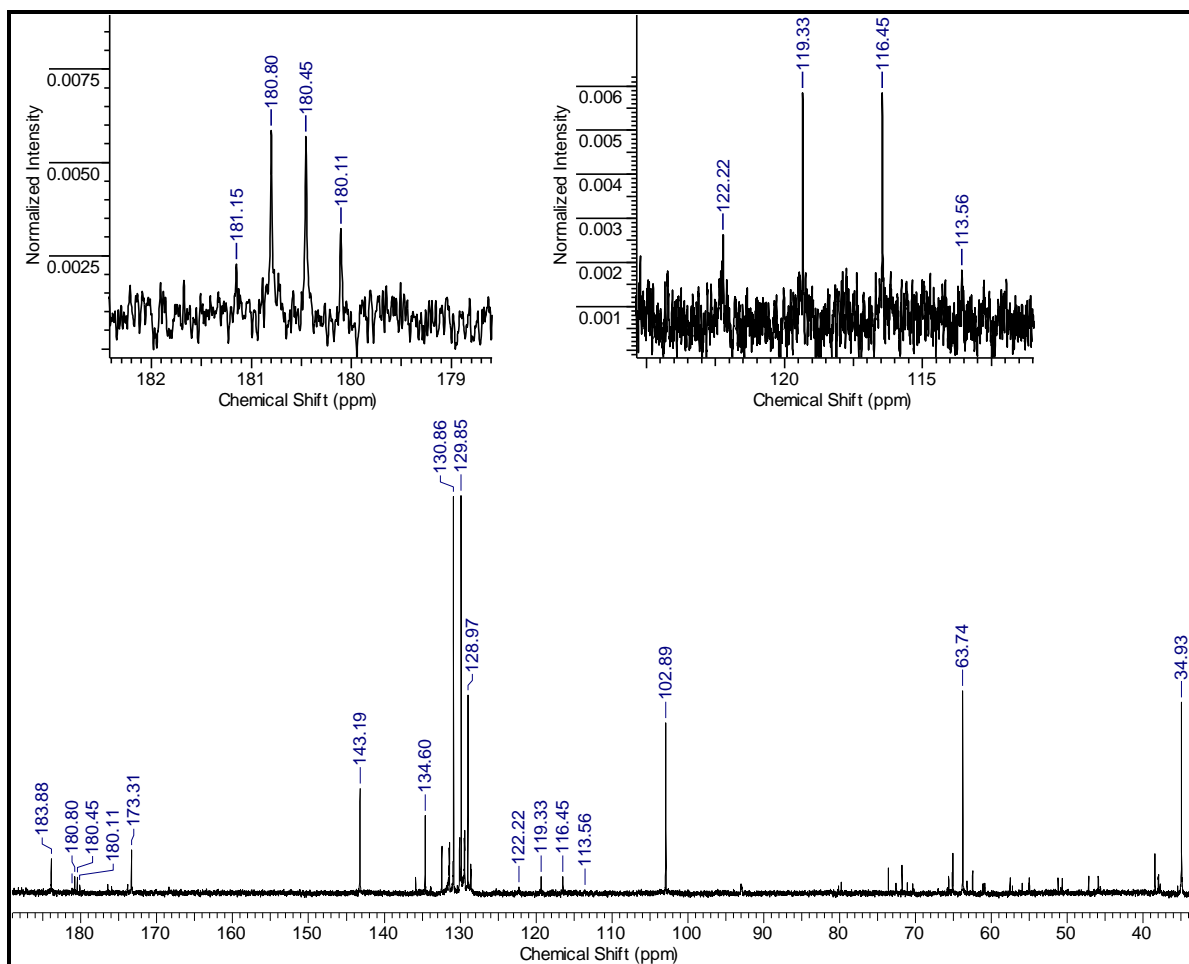


Fórmula molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$
 m/z (M^+) calculada: 328,04931

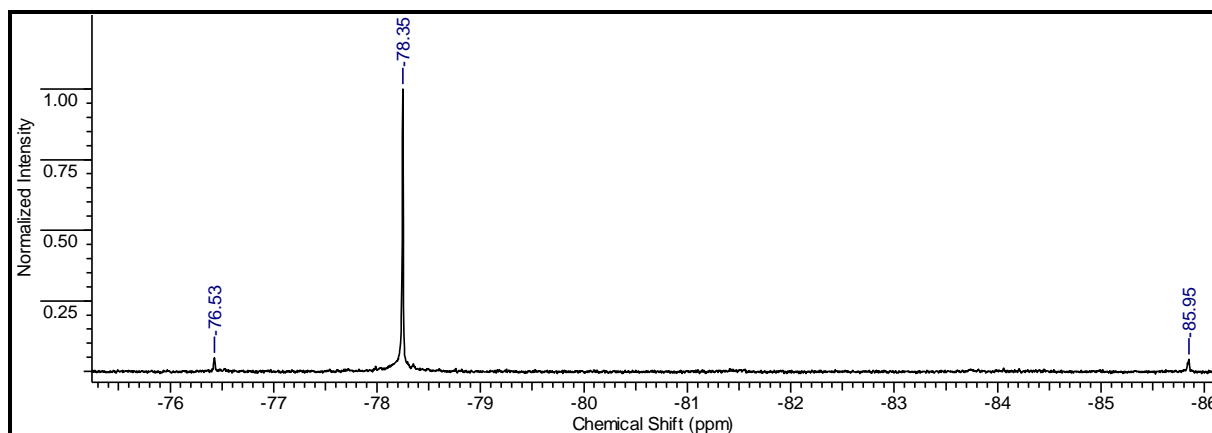
$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, acetone- d_6 , 22°C) δ (ppm): 3,31 (dd, $J_1 = 14,61$ Hz, $J_2=3,07$ Hz, 1H); 3,70 (dd, $J_1=5,26$ Hz, $J_2 = 3,07$ Hz, 1H); 6,60 (d, $J_1=14,24$ Hz, 1H); 8,86 (d, $J_1=14,24$ Hz, 1H); 11,48 (s(móvil), 1H).



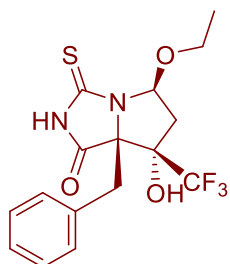
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.56 MHz, acetone- d_6) δ (ppm): 34,93; 63,74; 117,89 ($J_2=35,34$ Hz); 128,97; 129,85 (2C); 130,86 (2C); 134,60; 143,19; 173,31; 180,63 ($J_1=291,15$ Hz); 183,88.



^{19}F NMR (376.53 MHz, acetona- d_6 , 27°C) δ (ppm) = -78,35.

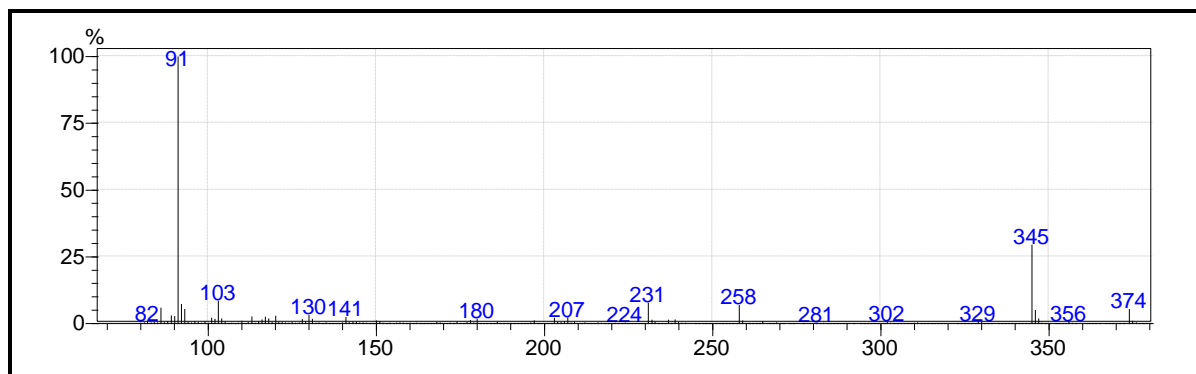


(5*S*,7*S*,7*aR*)-7*a*-bencil-5-etoxi-7-hidroxi-3-tioxo-7-(trifluorometil)hexahidro-1*H*-
pirrolo[1,2-*d*]imidazol-1-ona **60**

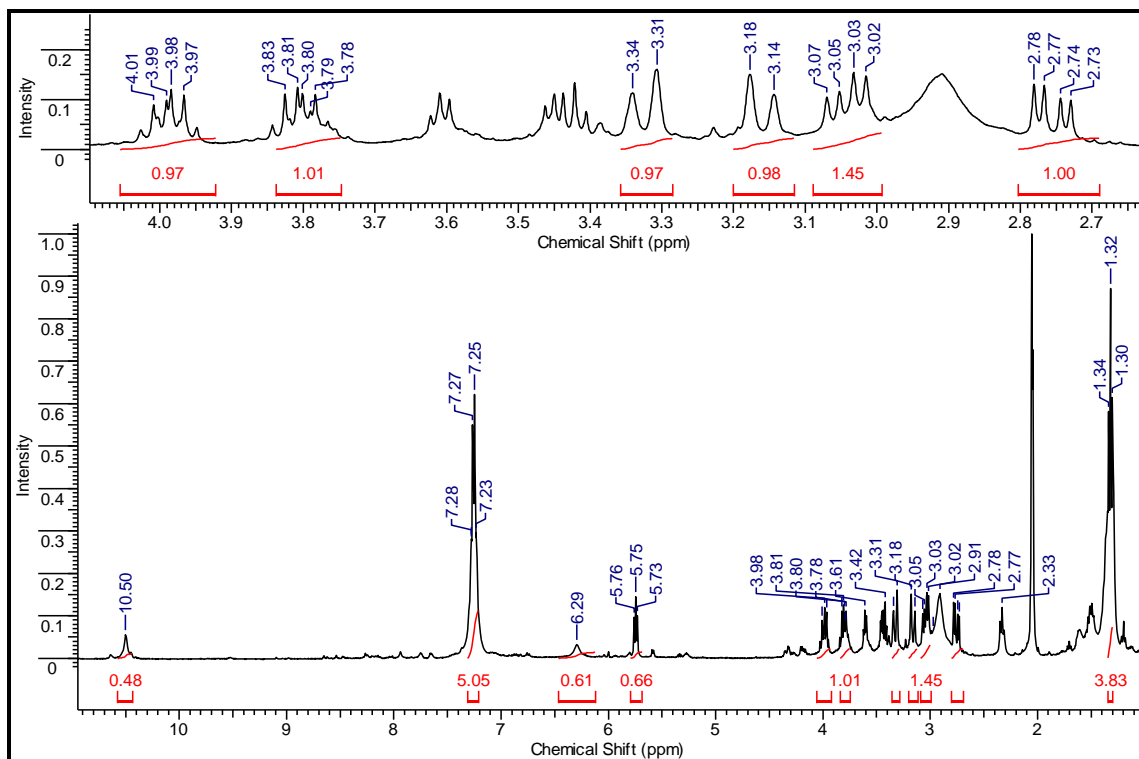


Fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$
m/z (M^+) calculada: 374,0912

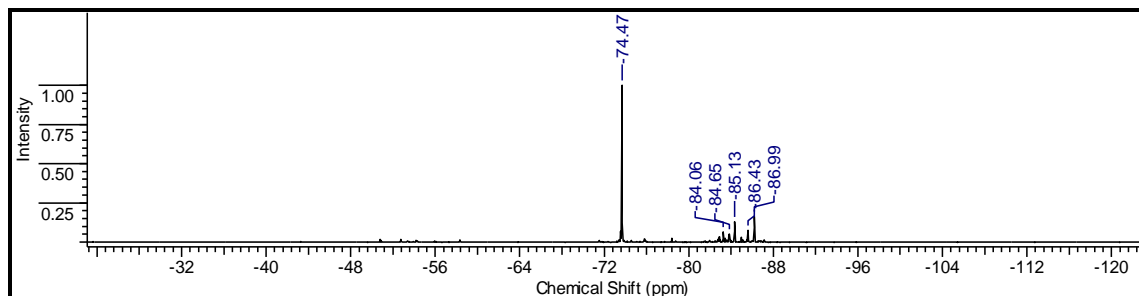
CG-EM (150 a 250 °C, 15 °C/min; t_R : 17,133 min): m/z (%) = 374 (M^+ , 5), 345 (30), 258 (7), 231 (8), 103 (9), 92 (7), 91 (100).



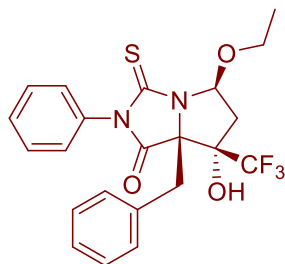
$^1\text{H-NMR}$ (400.16 MHz, acetone- d_6 , 22°C) δ (ppm): 2,76 (dd, 1H); 3,04 (dd, 1H); 3,16 (d, 1H); 3,33 (d, 1H); 3,81 (m, 1H); 3,98 (m, 1H); 10,50 (s(móvil), 1H).



$^{19}\text{F-NMR}$ (376.53 MHz, acetona- d_6 , 27°C) δ (ppm) = -74,47.

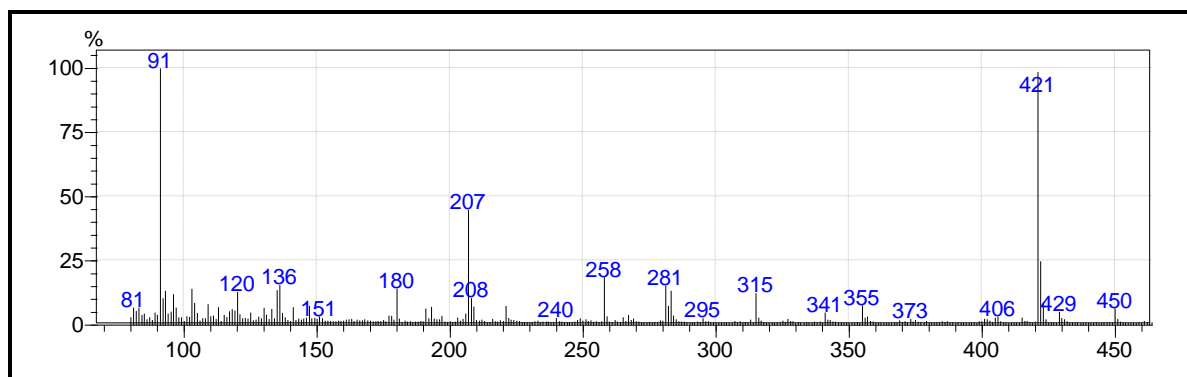


(5*S*,7*S*,7*aR*)-7*a*-bencil-5-etoxi-7-hidroxi-2-fenil-3-tioxi-7-(trifluorometil)hexahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1-ona **62**



Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$
 m/z (M^+) calculada: 450,1225

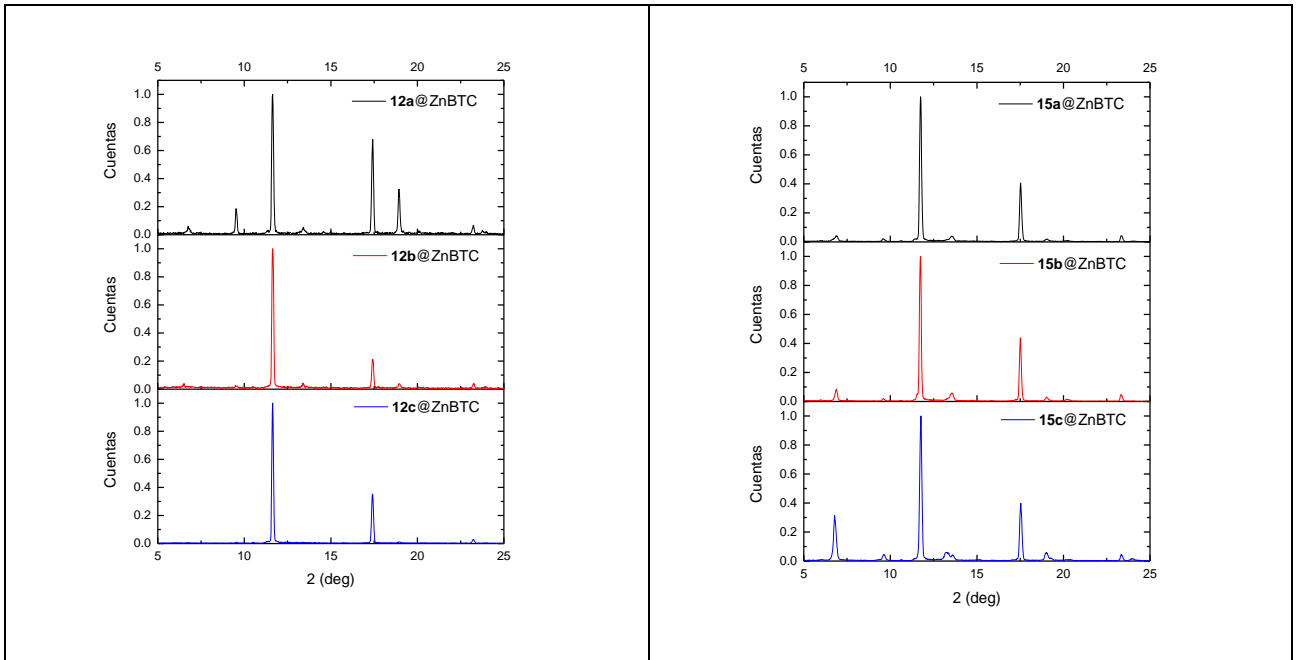
CG-EM (150 a 250 °C, 15 °C/min; t_R: 17,133 min): m/z (%) = 450 (M⁺, 6), 422 (25), 421 (99), 355 (3), 315 (12), 283 (13), 281 (15), 258 (19), 208 (10), 207 (45), 182 (14), 136 (16), 135 (14), 120 (13), 109 (8), 103 (14), 96 (12), 92 (10), 91 (100), 82 6).



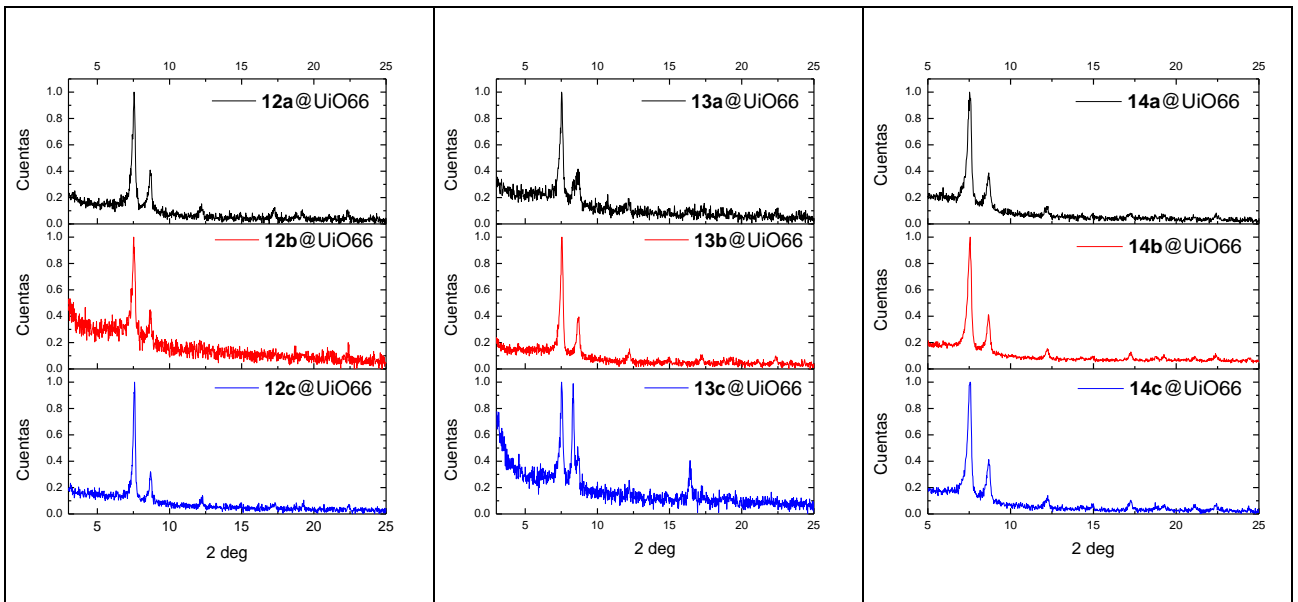
A.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO (PXRD)

En este apartado se ilustran los patrones de difracción de rayos X en polvo para los Ch@MOF elaborados y explicitados en el Capítulo 4. La adquisición se realizó en las instalaciones de la Universidad de Carolina del Sur.

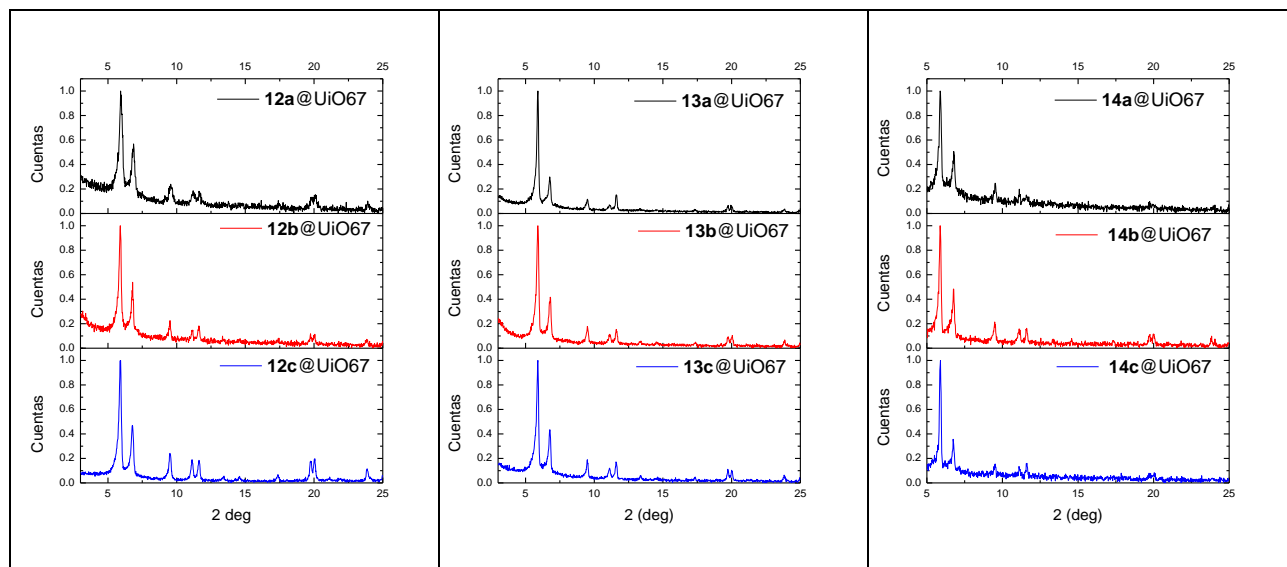
ZnBTC



UiO66

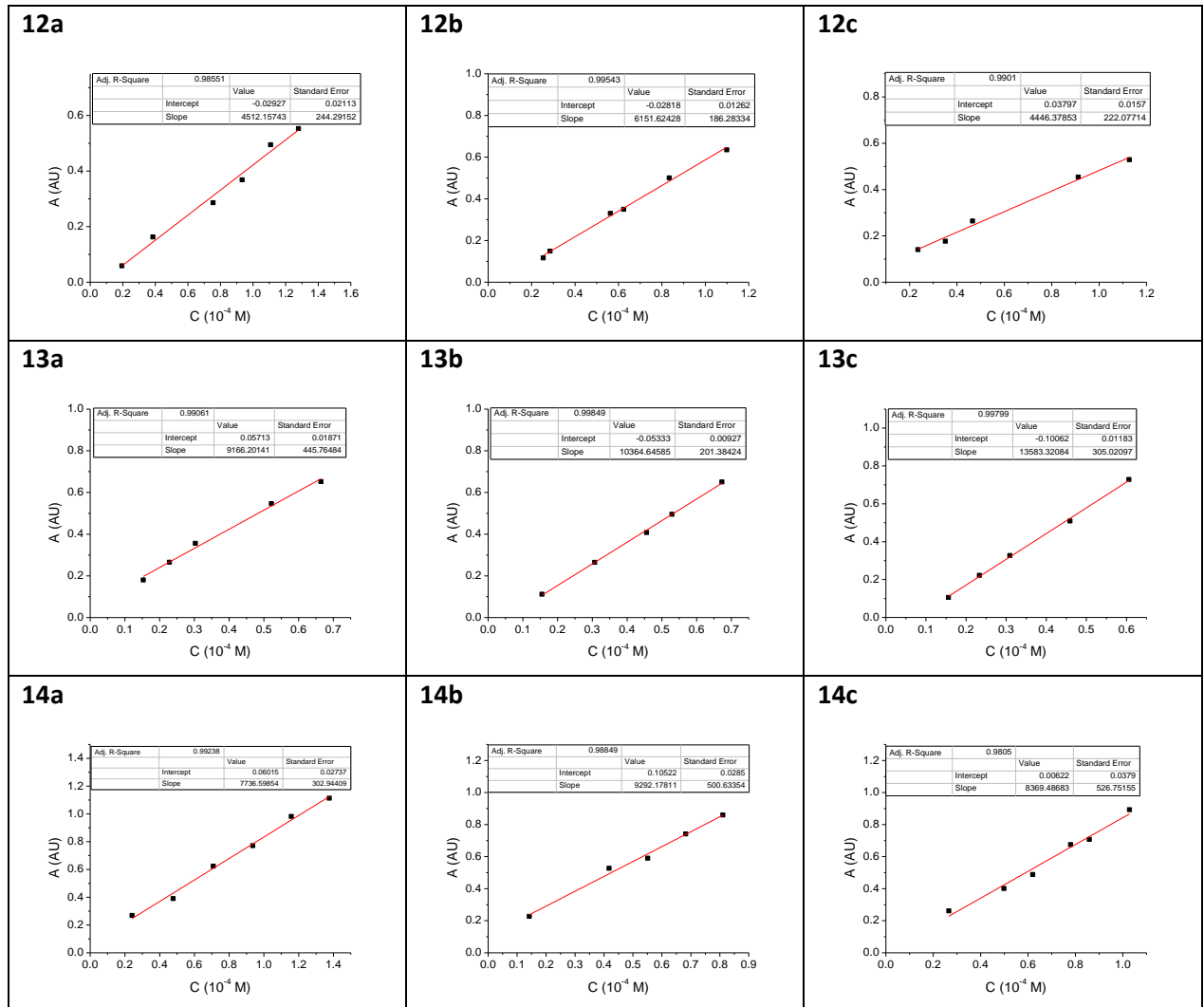


UiO67



A.3. CURVAS DE CALIBRACIÓN UV-VIS

Las siguientes curvas de calibración se realizaron a fin de cuantificar la cantidad de cromóforo incorporado dentro de los MOFs, como se indicó en el Capítulo 4. Dichos experimentos se realizaron en la Universidad de Carolina del Sur, empleando DMF como solvente y una celda de 1 cm de paso óptico.



Página en blanco

Referencias

Página en blanco

- (1) Baumann, M.; Baxendale, I. R.; Ley, S. V. The Flow Synthesis of Heterocycles for Natural Product and Medicinal Chemistry Applications. *Mol Divers* **2011**, *15* (3), 613–630. <https://doi.org/10.1007/s11030-010-9282-1>.
- (2) Mendgen, T.; Steuer, C.; Klein, C. D. Privileged Scaffolds or Promiscuous Binders: A Comparative Study on Rhodanines and Related Heterocycles in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (2), 743–753. <https://doi.org/10.1021/jm201243p>.
- (3) Streitwieser, A.; Heathcock, C. H. *Química Orgánica*, 3ra Edición.; Mc Graw Hill.
- (4) Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J.; Barluenga, J. *Modern Heterocyclic Chemistry, 4 Volume Set*; John Wiley & Sons, 2011.
- (5) Peláez, W. J.; Iriarte, A. G.; Szakonyi, Z.; Fülöp, F.; Argüello, G. A. Theoretical and Experimental Study on the Reaction Route for the FVP of 2-Thioxohexahydroquinazolinones. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2012**, *96*, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.04.004>.
- (6) Fülöp, F.; Bernáth, G.; Pihlaja, K. Synthesis, Stereochemistry and Transformations of Cyclopentane-, Cyclohexane-, Cycloheptane-, and Cyclooctane-Fused 1,3-Oxazines, 1,3-Thiazines, and Pyrimidines. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R., Ed.; Academic Press, 1997; Vol. 69, pp 349–477. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60085-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60085-9).
- (7) Peláez, W. J.; Szakonyi, Z.; Fülöp, F.; Yranzo, G. I. Flash Vacuum Pyrolysis (Fvp) of Some Hexahydroquinazolin-4(1H)-Ones. *Tetrahedron* **2008**, *64* (6), 1049–1057. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.07.010>.
- (8) Szymańska, E.; Kieć-Kononowicz, K. Antimycobacterial Activity of 5-Arylidene Aromatic Derivatives of Hydantoin. *Il Farmaco* **2002**, *57* (5), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01194-6](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01194-6).
- (9) Chazeau, V.; Cussac, M.; Boucherle, A. Study of 5-Arylidene-2-Thiohydantoins with Potential Immunomodulating and Anticancer Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27* (6), 615–625. [https://doi.org/10.1016/0223-5234\(92\)90140-V](https://doi.org/10.1016/0223-5234(92)90140-V).
- (10) Thenmozhiyal, J. C.; Wong, P. T.-H.; Chui, W.-K. Anticonvulsant Activity of Phenylmethylenhydantoins: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (6), 1527–1535. <https://doi.org/10.1021/jm030450c>.
- (11) Sortino, M.; Delgado, P.; Juárez, S.; Quiroga, J.; Abonía, R.; Insuasty, B.; Nogueras, M.; Rodero, L.; Garibotto, F. M.; Enriz, R. D.; et al. Synthesis and Antifungal Activity of (Z)-5-Arylidenerhodanines. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (1), 484–494. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.038>.
- (12) Bialonska, D.; Zjawiony, J. K. Aplysinopsins - Marine Indole Alkaloids: Chemistry, Bioactivity and Ecological Significance. *Mar Drugs* **2009**, *7* (2), 166–183. <https://doi.org/10.3390/md7020166>.
- (13) Jakše, R.; Rečnik, S.; Svete, J.; Golobič, A.; Golič, L.; Stanovnik, B. A Simple Synthesis of Aplysinopsin Analogues by Dimethylamine Substitution in N,N-(Dimethylamino)Methylidene Derivatives of Five-Membered Heterocycles. *Tetrahedron* **2001**, *57* (39), 8395–8403. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00838-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00838-9).
- (14) Hagmann, W. K. The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (15), 4359–4369. <https://doi.org/10.1021/jm800219f>.
- (15) Smart, B. E. Fluorine Substituent Effects (on Bioactivity). *J. Fluor. Chem.* **2001**, *109* (1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(01\)00375-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(01)00375-X).
- (16) Mendoza-Figueroa, H. L.; Serrano-Alva, M. T.; Aparicio-Ozores, G.; Martínez-Gudiño, G.; Suárez-Castillo, O. R.; Pérez-Rojas, N. A.; Morales-Ríos, M. S. Synthesis, Antimicrobial Activity, and Molecular Docking Study of Fluorine-Substituted Indole-Based Imidazolines. *Med Chem Res* **2018**, *27* (6), 1624–1633. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-2177-x>.
- (17) Bajpai, D.; Tyagi, V. K. Fatty Imidazolines: Chemistry, Synthesis, Properties and Their Industrial Applications. *J. Oleo Sci* **2006**, *55* (7), 319–329. <https://doi.org/10.5650/jos.55.319>.
- (18) Zimmer, M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (3), 759–782. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>.

- (19) Ikejiri, M.; Tsuchino, M.; Chihara, Y.; Yamaguchi, T.; Imanishi, T.; Obika, S.; Miyashita, K. Design and Concise Synthesis of a Novel Type of Green Fluorescent Protein Chromophore Analogue. *Org. Lett.* **2012**, *14* (17), 4406–4409. <https://doi.org/10.1021/ol301901e>.
- (20) Williams, D. E.; Dolgoplova, E. A.; Pellechia, P. J.; Palukoshka, A.; Wilson, T. J.; Tan, R.; Maier, J. M.; Greytak, A. B.; Smith, M. D.; Krause, J. A.; et al. Mimic of the Green Fluorescent Protein β -Barrel: Photophysics and Dynamics of Confined Chromophores Defined by a Rigid Porous Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (6), 2223–2226. <https://doi.org/10.1021/ja5131269>.
- (21) Dolgoplova, E. A.; Moore, T. M.; Fellows, W. B.; Smith, M. D.; Shustova, N. B. Photophysics of GFP-Related Chromophores Imposed by a Scaffold Design. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (24), 9884–9891. <https://doi.org/10.1039/C5DT05063D>.
- (22) Hintermair, U.; Gutel, T.; Slawin, A. M. Z.; Cole-Hamilton, D. J.; Santini, C. C.; Chauvin, Y. Direct in Situ Synthesis of Cationic N-Heterocyclic Carbene Iridium and Rhodium Complexes from Neat Ionic Liquid: Application in Catalytic Dehydrogenation of Cyclooctadiene. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693* (14), 2407–2414. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2008.04.017>.
- (23) Choi, J.; MacArthur, A. H. R.; Brookhart, M.; Goldman, A. S. Dehydrogenation and Related Reactions Catalyzed by Iridium Pincer Complexes. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (3), 1761–1779. <https://doi.org/10.1021/cr1003503>.
- (24) Ma, B.-D.; Du, S.-H.; Wang, Y.; Ou, X.-M.; Huang, M.-Z.; Wang, L.-X.; Wang, X.-G. Synthesis of Chiral Hydantoin Derivatives by Homogeneous Pd-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation. *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28* (1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.10.006>.
- (25) Lezanska, M.; Szymanski, G. S.; Pietrzyk, P.; Sojka, Z.; Lercher, J. A. Characterization of Cr–MCM-41 and Al,Cr–MCM-41 Mesoporous Catalysts for Gas-Phase Oxidative Dehydrogenation of Cyclohexane. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (4), 1830–1839. <https://doi.org/10.1021/jp066498u>.
- (26) Van Aken, K.; Strekowski, L.; Patiny, L. EcoScale, a Semi-Quantitative Tool to Select an Organic Preparation Based on Economical and Ecological Parameters. *Beilstein J Org Chem* **2006**, *2*, 3. <https://doi.org/10.1186/1860-5397-2-3>.
- (27) Ribeiro, M. G. T. C.; Costa, D. A.; Machado, A. A. S. C. “Green Star”: A Holistic Green Chemistry Metric for Evaluation of Teaching Laboratory Experiments. *Green Chem. Lett. Rev.* **2010**, *3* (2), 149–159. <https://doi.org/10.1080/17518251003623376>.
- (28) Kappe, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (46), 6250–6284. <https://doi.org/10.1002/anie.200400655>.
- (29) Knoevenagel, E. Condensation von Malonsäure mit aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1898**, *31* (3), 2596–2619. <https://doi.org/10.1002/cber.18980310308>.
- (30) Doebner, O. Synthese Der Sorbinsäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33* (2), 2140–2142. <https://doi.org/10.1002/cber.190003302121>.
- (31) Sykes, P. *Mecanismos de reacción en química orgánica*; Reverte, 1984.
- (32) Mase, N.; Horibe, T. Organocatalytic Knoevenagel Condensations by Means of Carbamic Acid Ammonium Salts. *Org. Lett.* **2013**, *15* (8), 1854–1857. <https://doi.org/10.1021/ol400462d>.
- (33) Mohite, A. R.; Bhat, R. G. A Practical and Convenient Protocol for the Synthesis of (E)- α,β -Unsaturated Acids. *Org. Lett.* **2013**, *15* (17), 4564–4567. <https://doi.org/10.1021/ol402130t>.
- (34) Beutler, U.; Fuenfschilling, P. C.; Steinkemper, A. An Improved Manufacturing Process for the Antimalaria Drug Coartem. Part II. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (3), 341–345. <https://doi.org/10.1021/op060244p>.
- (35) Baeyer, A. Untersuchungen Über Die Harnsäuregruppe. *Liebigs Ann.* **1863**, *127* (1), 1–27. <https://doi.org/10.1002/jlac.18631270102>.
- (36) King, S. B.; Stratford, E. S.; Craig, C. R.; Fifer, E. K. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Spiro-Analogues of 5-Benzyl-5-Ethyl Barbituric Acid. *Pharm Res* **1995**, *12* (8), 1240–1243. <https://doi.org/10.1023/A:1016236615559>.
- (37) Kappe, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed* **2004**, *43* (46), 6250–6284. <https://doi.org/10.1002/anie.200400655>.

- (38) Dwivedi, S.; Dubey, R.; Dwivedi, A.; Kaul, S.; Gupta, P. Microwave Synthesis: A Recent Advancement in the Field of Synthetic Chemistry. Part 1. Principle. *ChemInform* **2010**, *41* (22), no-no.
- (39) Glasnov, T. N.; Kappe, C. O. Microwave-Assisted Synthesis under Continuous-Flow Conditions. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28* (4), 395–410. <https://doi.org/10.1002/marc.200600665>.
- (40) Baeyer, A. Vorläufige Notiz Über Das Hydantoin. *Liebigs Ann.* **1861**, *117* (2), 178–180. <https://doi.org/10.1002/jlac.18611170204>.
- (41) Henson, E. B.; Gallop, P. M.; Hauschka, P. V. Synthesis of d,l-β-Carboxyaspatic Acid from Hydantoin-5-Malonic Acid Diethyl Ester. *Tetrahedron* **1981**, *37* (15), 2561–2562. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)98956-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)98956-2).
- (42) Konnert, L.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Colacino, E. Recent Advances in the Synthesis of Hydantoins: The State of the Art of a Valuable Scaffold. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (23), 13757–13809. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00067>.
- (43) Konnert, L.; Reneaud, B.; de Figueiredo, R. M.; Campagne, J.-M.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Colacino, E. Mechanochemical Preparation of Hydantoins from Amino Esters: Application to the Synthesis of the Antiepileptic Drug Phenytoin. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (21), 10132–10142. <https://doi.org/10.1021/jo5017629>.
- (44) Metwally, M. A.; Abdel-Latif, E. Thiohydantoins: Synthetic Strategies and Chemical Reactions. *J. Sulphur. Chem.* **2012**, *33* (2), 229–257. <https://doi.org/10.1080/17415993.2011.643550>.
- (45) Takano, S.; Kobayashi, T. Development of Novel UV Absorbent. *Journal of Society of Cosmetic Chemists of Japan* **1993**, *26* (4), 262–268. <https://doi.org/10.5107/sccj.26.262>.
- (46) López, C. A.; Trigo, G. G. The Chemistry of Hydantoins. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R., Ed.; Academic Press, 1985; Vol. 38, pp 177–228. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60920-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60920-4).
- (47) Merritt, H. H.; Putnam, T. J. SODIUM DIPHENYL HYDANTOINATE IN THE TREATMENT OF CONVULSIVE DISORDERS. *JAMA* **1938**, *111* (12), 1068–1073. <https://doi.org/10.1001/jama.1938.02790380010004>.
- (48) Muccioli, G. G.; Martin, D.; Scriba, G. K. E.; Poppitz, W.; Poupaert, J. H.; Wouters, J.; Lambert, D. M. Substituted 5,5'-Diphenyl-2-Thioxoimidazolidin-4-One as CB1 Cannabinoid Receptor Ligands: Synthesis and Pharmacological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (7), 2509–2517. <https://doi.org/10.1021/jm049263k>.
- (49) Brotchie, J. M. CB1 Cannabinoid Receptor Signalling in Parkinson's Disease. *Current Opinion in Pharmacology* **2003**, *3* (1), 54–61. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(02\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(02)00011-5).
- (50) Giacobozzo, C.; Monaco, H. L.; Viterbo, D.; Ferraris, G.; Gilli, G.; Zanotti, G.; Catti, M. *Fundamentals of Crystallography*; Oxford University Press, 2002.
- (51) Thenmozhiyal, J. C.; Wong, P. T.-H.; Chui, W.-K. Anticonvulsant Activity of Phenylmethylenhydantoins: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (6), 1527–1535. <https://doi.org/10.1021/jm030450c>.
- (52) Pepino, A. J.; Peláez, W. J.; Faillace, M. S.; Ceballos, N. M.; Moyano, E. L.; Argüello, G. A. (S)-5-Benzyl- and 5-Benzylidene-Imidazo-4-One Derivatives Synthesized and Studied for an Understanding of Their Thermal Reactivity. *RSC Adv.* **2014**, *4* (104), 60092–60101. <https://doi.org/10.1039/C4RA11046C>.
- (53) Okada, K.; Kelley, J. A.; Driscoll, J. S. Intramolecular Cyclizations Leading to Bridgehead Bicyclics. 3. 5,5-Diphenyl-2-Thiohydantoin Derivatives. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (15), 2594–2597. <https://doi.org/10.1021/jo00435a012>.
- (54) Jayasree, E. G.; Sreedevi, S. Density Functional Evaluation and a Feasibility Study of Intramolecular Thione-Thiol Tautomerization: JAYASREE and SREEDEVI. *International Journal of Quantum Chemistry* **2017**, e25427. <https://doi.org/10.1002/qua.25427>.
- (55) Książek, W.; Kieć-Kononowicz, K.; Karolak-Wojciechowska, J. Crystal and Molecular Structure of 5-Benzylidene-2-Thiohydantoin: The S...S Intermolecular Interactions between Two CS Groups. *J. Mol. Struct* **2009**, *921* (1), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.12.060>.
- (56) Chang, X.-H. (5Z)-5-Benzyl-ideneimidazolidine-2,4-Dione. *Acta Cryst E* **2006**, *62* (11), o5184–o5185. <https://doi.org/10.1107/S1600536806043182>.
- (57) Jia, H.-H.; Ni, F.; Wang, J.; Wei, P.; Ouyang, P.-K. 5-(4-Fluoro-benzyl-idene)Imidazolidine-2,4-Dione. *Acta Cryst E* **2005**, *61* (9), o2784–o2786. <https://doi.org/10.1107/S1600536805024104>.

- (58) Dolgoplova, E. A.; Rice, A. M.; Smith, M. D.; Shustova, N. B. Photophysics, Dynamics, and Energy Transfer in Rigid Mimics of GFP-Based Systems. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (15), 7257–7264. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b00835>.
- (59) Panini, P.; Chopra, D. Understanding of Noncovalent Interactions Involving Organic Fluorine. In *Hydrogen Bonded Supramolecular Structures*; Li, Z.-T., Wu, L.-Z., Eds.; Lecture Notes in Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015; pp 37–67. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45756-6_2.
- (60) Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (21), 8315–8359. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00258>.
- (61) THAYER, A. M. FABULOUS FLUORINE. *Chem. Eng. News Archive* **2006**, *84* (23), 15–24. <https://doi.org/10.1021/cen-v084n023.p015>.
- (62) Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L. *Química inorgánica: principios de estructura y reactividad*; Alfaomega, 1997.
- (63) Uneyama, K. *Organofluorine Chemistry*; John Wiley & Sons, 2008.
- (64) Wang, J.; Sánchez-Roselló, M.; Aceña, J. L.; del Pozo, C.; Sorochinsky, A. E.; Fustero, S.; Soloshonok, V. A.; Liu, H. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). *Chem. Rev.* **2014**, *114* (4), 2432–2506. <https://doi.org/10.1021/cr4002879>.
- (65) Marais, J. S. C. Monofluoroacetic Acid, the Toxic Principle of “Gifblaar”, *Dichapetalum Cymosum* (Hook) Engl. **1944**.
- (66) Fried, J.; Sabo, E. F. SYNTHESIS OF 17 α -HYDROXYCORTICOSTERONE AND ITS 9 α -HALO DERIVATIVES FROM 11-EPI-17 α -HYDROXYCORTICOSTERONE. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (9), 2273–2274. <https://doi.org/10.1021/ja01105a527>.
- (67) Thornberry, N. A.; Weber, A. E. Discovery of JANUVIA® (Sitagliptin), a Selective Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type2 Diabetes. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ctmc/2007/00000007/00000006/art00003> (accessed Feb 4, 2019). <https://doi.org/info:doi/10.2174/156802607780091028>.
- (68) Peláez, W. J.; Burgos Paci, M. A.; Argüello, G. A. A Closer Insight into the Mechanism Operating in the Trifluoroacetylation of Pyrrole. New Trifluoromethyl Pyrrolymethane Discovered. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (17), 1934–1938. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.02.048>.
- (69) Peláez, W. J.; Argüello, G. A. Co-Thermolysis: A One-Pot Synthetic Method for Novel 2-Substituted-5-(Trifluoromethoxy)Thiophenes. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (40), 5242–5245. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.07.111>.
- (70) Pepino, A. J.; Peláez, W. J.; Moyano, E. L.; Argüello, G. A. Highly Efficient Dehydrogenation of 5-Benzyl-3-Phenyl-2-Thioxoimidazolidin-4-One: Microwave versus Flash Vacuum Pyrolysis Conditions. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (18), 3424–3430. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200257>.
- (71) Joshi, K. C.; Pathak, V. N.; Goyal, M. K. Fluorine Containing Bioactive Heterocycles. Part II. Synthesis of Some New Fluorine Containing Arylglyoxals, Their Hydrates and 1,5-Disubstituted Hydantoins. *J. Heterocycl. Chem* **1981**, *18* (8), 1651–1653. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570180836>.
- (72) Prakash, G. K. S.; Krishnamurti, R.; Olah, G. A. Fluoride-Induced Trifluoromethylation of Carbonyl Compounds with Trifluoromethyltrimethylsilane (TMS-CF₃): A Trifluoromethide Equivalent. In *Across Conventional Lines*; World Scientific Series in 20th Century Chemistry; World Scientific Publishing Company, 2003; pp 1027–1029. https://doi.org/10.1142/9789812791405_0206.
- (73) Joubert, J.; Roussel, S.; Christophe, C.; Billard, T.; Langlois, B. R.; Vidal, T. Trifluoroacetamides from Amino Alcohols as Nucleophilic Trifluoromethylating Reagents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (27), 3133–3136. <https://doi.org/10.1002/anie.200351301>.
- (74) Omelichkin, N. I.; Minyaeva, L. G.; Mezheritskii, V. V. Trifluoroacetylation of 3-Methyl-1H-1,2-Diazaphenalenenes of the Naphthalene and Acenaphthene Series. *Russ J Org Chem* **2016**, *52* (4), 562–566. <https://doi.org/10.1134/S1070428016040151>.
- (75) Nunes, C. M.; Ramos Silva, M.; Matos Beja, A.; Fausto, R.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Cycloaddition of Trifluoromethyl Azafulvenium Methides: Synthesis of New Trifluoromethylpyrrole-Annulated Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (2), 411–414. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.11.033>.

- (76) Andrew, R. J.; Mellor, J. M. Synthesis of Trifluoromethylpyrroles and Related Heterocycles from 4-Ethyloxy-1,1,1-Trifluorobut-3-Ene-2-One. *Tetrahedron* **2000**, *56* (37), 7267–7272. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00598-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00598-6).
- (77) Jiang, H.; Zhu, S. Unexpected Formation of Trifluoromethylated Spiro or Fused Cyclic Compounds from 4-Ethyloxy-1,1,1-Trifluoro-3-Buten-2-One and Silyl Enol Ethers. *Synlett* **2006**, *2006* (9), 1343–1346. <https://doi.org/10.1055/s-2006-941574>.
- (78) Peláez, W. J.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Synthesis and Thermal Reactivity of 3-Benzyl-7-Trifluoromethyl-1H,3H-Pyrrolo[1,2-c]Thiazole-2,2-Dioxide. *Tetrahedron* **2013**, *69* (18), 3646–3655. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.03.017>.
- (79) Peláez, W. J.; Pepino, A. J.; Argüello, G. A.; Pinho e Melo, T. M. V. D. 1-Methyl-5-(Trifluoromethyl)Azafulvenium Methide, an Intermediate That Undergoes Reaction through “Unusual” *Cis - Exo -1,3-* and *Trans - Exo -1,7-*Cycloadditions: Unusual *Cis - Exo -1,3-* and *Trans - Exo -1,7-*Cycloadditions. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (14), 2933–2941. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301922>.
- (80) Firpo, G.; Cooke, M. V.; Peláez, W. J.; Chans, G. M.; Argüello, G. A.; Gómez, E.; Alvarez-Toledano, C. Rearomatization of Trifluoromethyl Sulfonyl Dihydropyridines: Thermolysis vs Photolysis. *J Phys Org Chem.* **2017**, *32* (1), e3789. <https://doi.org/10.1002/poc.3789>.
- (81) Hojo, M.; Masuda, R.; Kokuryo, Y.; Shioda, H.; Matsuo, S. Electrophilic Substitutions of Olefinic Hydrogens II. Acylation of Vinyl Ethers and n-Vinyl Amides. *Chem. Lett.* **1976**, *5* (5), 499–502. <https://doi.org/10.1246/cl.1976.499>.
- (82) Pryadeina, M. V.; Khudina, O. G.; Burgart, Y. V.; Saloutin, V. I.; Chupakhin, O. N. New Reactions of Fluorinated 2,4-Dioxoesters with Aromatic Aldehydes. *Mendeleev Communications* **2006**, *16* (3), 188–189. <https://doi.org/10.1070/MC2006v016n03ABEH002322>.
- (83) Singhal, M.; Paul, A.; Singh, H. P. Synthesis and Reducing Power Assay of Methyl Semicarbazone Derivatives. *J. Saudi Chem. Soc.* **2011**, *18* (2), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.06.004>.
- (84) Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2013**, *85* (5), 957–998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.
- (85) Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst* **2002**, *127* (1), 183–198. <https://doi.org/10.1039/B009171P>.
- (86) Gutteridge, J. M. Reactivity of Hydroxyl and Hydroxyl-like Radicals Discriminated by Release of Thiobarbituric Acid-Reactive Material from Deoxy Sugars, Nucleosides and Benzoate. *Biochem J* **1984**, *224* (3), 761–767.
- (87) Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
- (88) Alimentación de los Flamencos - Flamencos Información y Características <https://www.flamingos-world.com/es/alimentacion-de-los-flamencos/> (accessed Mar 14, 2019).
- (89) Krinsky, N. I. The Carotenoids of the Brine Shrimp, *Artemia Salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **1965**, *16* (2), 181–187. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(65\)90057-5](https://doi.org/10.1016/0010-406X(65)90057-5).
- (90) Lagarto Parra, A.; Silva Yhebra, R.; Guerra Sardiñas, I.; Iglesias Buela, L. Comparative Study of the Assay of *Artemia Salina* L. and the Estimate of the Medium Lethal Dose (LD50 Value) in Mice, to Determine Oral Acute Toxicity of Plant Extracts. *Phytomedicine* **2001**, *8* (5), 395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>.
- (91) Atta-ur-Rahman; Choudhary, M. I.; Thomsen, W. J.; Choudhary, M. I.; Thomsen, W. J. *Bioassay Techniques for Drug Development*; CRC Press, 2001. <https://doi.org/10.3109/9780203304532>.
- (92) Koutsaftis, A.; Aoyama, I. Toxicity of Four Antifouling Biocides and Their Mixtures on the Brine Shrimp *Artemia Salina*. *Sci Total Environ.* **2007**, *387* (1), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.023>.
- (93) Gajardo, G. M.; Beardmore, J. A. The Brine Shrimp *Artemia*: Adapted to Critical Life Conditions. *Front Physiol* **2012**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00185>.
- (94) Andrews, J. M. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J Antimicrob Chemother* **2001**, *48* (suppl_1), 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- (95) Frère, J.-M.; Rigali, S. The Alarming Increase in Antibiotic-Resistant Bacteria. *Drug Targets Rev* **2016**, *3*, 26–30.

- (96) Smith, E. C. J.; Kaatz, G. W.; Seo, S. M.; Wareham, N.; Williamson, E. M.; Gibbons, S. The Phenolic Diterpene Totarol Inhibits Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, *51* (12), 4480–4483. <https://doi.org/10.1128/AAC.00216-07>.
- (97) Branchi, B.; Galli, C.; Gentili, P. Kinetics of Oxidation of Benzyl Alcohols by the Dication and Radical Cation of ABTS. Comparison with Laccase–ABTS Oxidations: An Apparent Paradox. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (14), 2604–2614. <https://doi.org/10.1039/B504199F>.
- (98) Solís-Oba, M.; Bárzana, E.; García-Garibay, M.; Viniegra-González, G. El ABTS•+ Agente Oxidante de Diversos Compuestos Químicos y Su Mecanismo de Reciclado Entre La Lacasa y El Sustrato. *Revista mexicana de ingeniería química* **2007**, *6* (3), 275–281.
- (99) Burriel Martí, F.; Lucena Conde, F.; Arribas Jimeno, S.; Hernández Méndez, J. *Química analítica cualitativa*; Editorial Paraninfo, 2002.
- (100) Amorati, R.; Menichetti, S.; Viglianisi, C.; Foti, M. C. Proton–Electron Transfer Pathways in the Reactions of Peroxyl and Dpph• Radicals with Hydrogen-Bonded Phenols. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (97), 11904–11906. <https://doi.org/10.1039/C2CC36531F>.
- (101) Foti, M.; Ruberto, G. Kinetic Solvent Effects on Phenolic Antioxidants Determined by Spectrophotometric Measurements. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (1), 342–348. <https://doi.org/10.1021/jf0006527>.
- (102) Firpo, G.; Ramírez, M. L.; Faillace, M. S.; de Brito, M. dos R. M.; e Silva, A. P. S. C. L.; Costa, J. P.; Rodríguez, M. C.; Argüello, G. A.; Szakonyi, Z.; Fülöp, F.; et al. Evaluation of the Antioxidant Activity of Cis/Trans-N-Phenyl-1,4,4a,5,8,8a-Hexahydro-3,1-Benzoxazin-2-Imines. *Antioxidants* **2019**, *8* (6), 197. <https://doi.org/10.3390/antiox8060197>.
- (103) Ware, M. Prussian Blue: Artists' Pigment and Chemists' Sponge. *J. Chem. Educ.* **2008**, *85* (5), 612. <https://doi.org/10.1021/ed085p612>.
- (104) Kishida, E.; Kamura, A.; Tokumaru, S.; Oribe, M.; Iguchi, H.; Kojo, S. Re-Evaluation of Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactive Substances as Indexes of Autoxidation Based on Oxygen Consumption. **2002**. <https://doi.org/10.1021/jf00025a001>.
- (105) Jamialahmadi, K.; Arasteh, O.; Matbou Riahi, M.; Mehri, S.; Riahi-Zanjani, B.; Karimi, G. Protective Effects of Glucosamine Hydrochloride against Free Radical-Induced Erythrocytes Damage. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *38* (1), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.018>.
- (106) Takebayashi, J.; Chen, J.; Tai, A. A Method for Evaluation of Antioxidant Activity Based on Inhibition of Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*; Armstrong, D., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; pp 287–296. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_20.
- (107) Pn, S.; Cw, W.; Mm, A.; Mp, G.; Jd, P. A Microwell Cytotoxicity Assay Using *Artemia Salina* (Brine Shrimp). *Planta Med* **1993**, *59* (3), 250–252.
- (108) Barreto, H. M.; de Lima, I. S.; Coelho, K. M. R. N.; Osório, L. R.; de Almeida Mourão, R.; Santos, B. H. C. dos; Coutinho, H. D. M.; de Abreu, A. P. L.; de Medeiros, M. das G. F.; Citó, A. M. das G. L.; et al. Effect of *Lippia Origanoides* H.B.K. Essential Oil in the Resistance to Aminoglycosides in Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Eur. J. Integr. Med.* **2014**, *6* (5), 560–564. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.03.011>.
- (109) U.S. National Library of Medicine: Norfloxacin <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=Norfloxacin> (accessed Mar 20, 2019).
- (110) Markham, P. N.; Neyfakh, A. A. Inhibition of the Multidrug Transporter NorA Prevents Emergence of Norfloxacin Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**, *40* (11), 2673–2674.
- (111) Coêlho, M. L.; Ferreira, J. H. L.; de Siqueira Júnior, J. P.; Kaatz, G. W.; Barreto, H. M.; de Carvalho Melo Cavalcante, A. A. Inhibition of the NorA Multi-Drug Transporter by Oxygenated Monoterpenes. *Microbial Pathogenesis* **2016**, *99*, 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.026>.
- (112) Bauer, A. W.; Perry, D. M.; Kirby, W. M. M. Single-Disk Antibiotic-Sensitivity Testing of *Staphylococci*: An Analysis of Technique and Results. *AMA Arch Intern Med* **1959**, *104* (2), 208–216. <https://doi.org/10.1001/archinte.1959.00270080034004>.

- (113) Harwick, H. J.; Weiss, P.; Fekety, F. R. Application of Microtitration Techniques to Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotic Susceptibility Testing. *J Lab Clin Med.* **1968**, *72* (3), 511–516. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:002221436890173X>.
- (114) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Eur. J. Biochem* **2000**, *267* (17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.
- (115) Bolla, J.-M.; Alibert-Franco, S.; Handzlik, J.; Chevalier, J.; Mahamoud, A.; Boyer, G.; Kieć-Kononowicz, K.; Pagès, J.-M. Strategies for Bypassing the Membrane Barrier in Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria. *FEBS Letters* **2011**, *585* (11), 1682–1690. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.054>.
- (116) Kasim, N. A.; Whitehouse, M.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Lennernäs, H.; Hussain, A. S.; Junginger, H. E.; Stavchansky, S. A.; Midha, K. K.; Shah, V. P.; et al. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Mol. Pharmaceutics* **2004**, *1* (1), 85–96. <https://doi.org/10.1021/mp034006h>.
- (117) Jan Koch-Weser, M. D. Metoprolol | NEJM. *New England Journal of Medicine* **1979**.
- (118) Oyaizu, M. Studies on Products of Browning Reaction: Antioxidative Activity of Products of Browning Reaction. *Jpn. J. Nutr* **1986**, *44* (6).
- (119) Guimarães, A. G.; Oliveira, G. F.; Melo, M. S.; Cavalcanti, S. C. H.; Antonioli, A. R.; Bonjardim, L. R.; Silva, F. A.; Santos, J. P. A.; Rocha, R. F.; Moreira, J. C. F.; et al. Bioassay-Guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2010**, *107* (6), 949–957. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00609.x>.
- (120) Borra, R. C.; Lotufo, M. A.; Gagioti, S. M.; Barros, F. de M.; Andrade, P. M. A Simple Method to Measure Cell Viability in Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Brazilian Oral Research* **2009**, *23* (3), 255–262. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242009000300006>.
- (121) Coutinho, H. D. M.; Costa, J. G. M.; Falcão-Silva, V. S.; Siqueira-Júnior, J. P.; Lima, E. O. Potentiation of Antibiotic Activity by *Eugenia Uniflora* and *Eugenia Jambolanum*. *J. Med. Food.* **2010**, *13* (4), 1024–1026. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0158>.
- (122) Gai, F.; Hasson, K. C.; McDonald, J. C.; Anfinrud, P. A. Chemical Dynamics in Proteins: The Photoisomerization of Retinal in Bacteriorhodopsin. *Science* **1998**, *279* (5358), 1886–1891. <https://doi.org/10.1126/science.279.5358.1886>.
- (123) Davenport D.; Nicol J. A. C.; Russell Frederick Stratten. Luminescence in Hydromedusae. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol]* **1955**, *144* (916), 399–411. <https://doi.org/10.1098/rspb.1955.0066>.
- (124) Bajaj, A.; Rana, S.; R. Miranda, O.; C. Yawe, J.; Joseph Jerry, D.; F. Bunz, U. H.; M. Rotello, V. Cell Surface - Based Differentiation of Cell Types and Cancer States Using a Gold Nanoparticle-GFP Based Sensing Array. *Chemical Science* **2010**, *1* (1), 134–138. <https://doi.org/10.1039/C0SC00165A>.
- (125) Kanda, T.; Sullivan, K. F.; Wahl, G. M. Histone-GFP Fusion Protein Enables Sensitive Analysis of Chromosome Dynamics in Living Mammalian Cells. *Current Biology* **1998**, *8* (7), 377–385. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70156-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70156-3).
- (126) Wang, Y.; Yu, Y.; Shabahang, S.; Wang, G.; Szalay, A. Renilla Luciferase-Aequorea GFP (Ruc-GFP) Fusion Protein, a Novel Dual Reporter for Real-Time Imaging of Gene Expression in Cell Cultures and in Live Animals. *Mol Gen Genomics* **2002**, *268* (2), 160–168. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0751-9>.
- (127) Niwa, H.; Inouye, S.; Hirano, T.; Matsuno, T.; Kojima, S.; Kubota, M.; Ohashi, M.; Tsuji, F. I. Chemical Nature of the Light Emitter of the *Aequorea* Green Fluorescent Protein. *PNAS* **1996**, *93* (24), 13617–13622. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13617>.
- (128) Dong, J.; Abulwerdi, F.; Baldrige, A.; Kowalik, J.; Solntsev, K. M.; Tolbert, L. M. Isomerization in Fluorescent Protein Chromophores Involves Addition/Elimination. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (43), 14096–14098. <https://doi.org/10.1021/ja803416h>.
- (129) Merino, E.; Ribagorda, M. Control over Molecular Motion Using the Cis-Trans Photoisomerization of the Azo Group. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2012**, *8* (1), 1071–1090. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.119>.
- (130) Credi, A. Artificial Molecular Motors Powered by Light. *Aust. J. Chem.* **2006**, *59* (3), 157–169. <https://doi.org/10.1071/CH06025>.

- (131) Martínez-López, D.; Yu, M.-L.; García-Iriepa, C.; Campos, P. J.; Frutos, L. M.; Golen, J. A.; Rasapalli, S.; Sampedro, D. Hydantoin-Based Molecular Photoswitches. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (8), 3929–3939. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b00244>.
- (132) Fischer, E. Calculation of Photostationary States in Systems A + B When Only A Is Known. *J. Phys. Chem.* **1967**, *71* (11), 3704–3706. <https://doi.org/10.1021/j100870a063>.
- (133) Majouga, A. G.; Udina, A. V.; Beloglazkina, E. K.; Skvortsov, D. A.; Zvereva, M. I.; Dontsova, O. A.; Zyk, N. V.; Zefirov, N. S. Novel DNA Fluorescence Probes Based on 2-Thioxo-Tetrahydro-4H-Imidazol-4-Ones: Synthetic and Biological Studies. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (1), 51–53. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.10.118>.
- (134) Lepecq, J.-B.; Paoletti, C. A Fluorescent Complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids: Physical—Chemical Characterization. *J. Mol. Biol.* **1967**, *27* (1), 87–106. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90353-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90353-1).
- (135) Rajski, S. R.; Williams, R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (8), 2723–2796. <https://doi.org/10.1021/cr9800199>.
- (136) Dolgoplova, E. A.; Williams, D. E.; Greytak, A. B.; Rice, A. M.; Smith, M. D.; Krause, J. A.; Shustova, N. B. A Bio-Inspired Approach for Chromophore Communication: Ligand-to-Ligand and Host-to-Guest Energy Transfer in Hybrid Crystalline Scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (46), 13639–13643. <https://doi.org/10.1002/anie.201507400>.
- (137) Dolgoplova, E. A.; Shustova, N. B. Metal–Organic Framework Photophysics: Optoelectronic Devices, Photoswitches, Sensors, and Photocatalysts. *MRS Bulletin* **2016**, *41* (11), 890–896. <https://doi.org/10.1557/mrs.2016.246>.
- (138) Llabrés i Xamena, F. X.; Abad, A.; Corma, A.; Garcia, H. MOFs as Catalysts: Activity, Reusability and Shape-Selectivity of a Pd-Containing MOF. *J. Catal.* **2007**, *250* (2), 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2007.06.004>.
- (139) Xie, W.; Zhang, S.-R.; Du, D.-Y.; Qin, J.-S.; Bao, S.-J.; Li, J.; Su, Z.-M.; He, W.-W.; Fu, Q.; Lan, Y.-Q. Stable Luminescent Metal–Organic Frameworks as Dual-Functional Materials To Encapsulate Ln³⁺ Ions for White-Light Emission and To Detect Nitroaromatic Explosives. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (7), 3290–3296. <https://doi.org/10.1021/ic5029383>.
- (140) Pepino, A. J.; Burgos Paci, M. A.; Peláez, W. J.; Argüello, G. A. An Experimental and Theoretical Study of the Photoisomerization and Thermal Reversion on 5-Arylmethylene-2-Thioxoimidazolidin-4-One. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (19), 12927–12934. <https://doi.org/10.1039/C4CP04748F>.
- (141) Pouët, M.-F.; Baures, E.; Vaillant, S.; Thomas, O. Hidden Isosbestic Point(s) in Ultraviolet Spectra. *Appl Spectrosc* **2004**, *58* (4), 486–490. <https://doi.org/10.1366/000370204773580365>.
- (142) Olah, G. A.; Kiovsky, T. E. Stable Carbonium Ions. II. Fluorobenzenonium Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (22), 5692–5694.
- (143) Dolgoplova, E. A.; Rice, A. M.; Smith, M. D.; Shustova, N. B. Photophysics, Dynamics, and Energy Transfer in Rigid Mimics of GFP-Based Systems. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (15), 7257–7264. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b00835>.
- (144) Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem Rev* **2009**, *109* (5), 1948–1998. <https://doi.org/10.1021/cr030183i>.
- (145) Stockwell, B. R. Exploring Biology with Small Organic Molecules. *Nature* **2004**, *432*, 846–854. <https://doi.org/10.1038/nature03196>.
- (146) Rescifina, A.; Zagni, C.; Varrica, M. G.; Pistarà, V.; Corsaro, A. Recent Advances in Small Organic Molecules as DNA Intercalating Agents: Synthesis, Activity, and Modeling. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 95–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.029>.
- (147) Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H.-A. Intercalation of Antitumor Drug Doxorubicin and Its Analogue by DNA Duplex: Structural Features and Biological Implications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *66*, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.028>.
- (148) Paige, J. S.; Wu, K. Y.; Jaffrey, S. R. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein. *Science* **2011**, *333* (6042), 642–646. <https://doi.org/10.1126/science.1207339>.

- (149) Ihmels, H.; Otto, D. Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA -- General Principles and Recent Developments. In *Supramolecular Dye Chemistry*; Würthner, F., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005; pp 161–204. <https://doi.org/10.1007/b135804>.
- (150) Varnes, A. W.; Dodson, R. B.; Wehry, E. L. Interactions of Transition-Metal Ions with Photoexcited States of Flavines. Fluorescence Quenching Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (3), 946–950. <https://doi.org/10.1021/ja00758a037>.
- (151) Yang, W.; Chen, X.; Su, H.; Fang, W.; Zhang, Y. The Fluorescence Regulation Mechanism of the Paramagnetic Metal in a Biological HNO Sensor. *Chem Commun (Camb)* **2015**, *51* (47), 9616–9619. <https://doi.org/10.1039/c5cc00787a>.