

Síntesis y estudio de docking molecular de un complejo de paladio (II) derivado de 2-(2'-piridil)benzimidazol con un fragmento carbohidrato

Tabares Flores Sebastián, Corona Sánchez Ricardo*, Gutiérrez Carrillo Atilano, Lara Corona Víctor Hugo, Rincón Guevara Mónica Alejandra

Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc., Ciudad de México, C.P. 09340. México.

*Autor para correspondencia: rcorona@xanum.uam.mx

ORCID : 0000-0002-2520-2798

Recibido:
30/junio/2022

Aceptado:
14/septiembre/2022

Palabras clave:
Complejo paladio (II),
carbohidrato,
2-(2'-piridil)benzimidazol

Keywords:
Palladium (II) complex,
carbohydrate,
2-(2'-pyridyl)benzimidazole

RESUMEN

En este trabajo se presenta la síntesis y caracterización de un nuevo complejo de paladio (II) derivado del ligante bidentado 2-(2'-piridil)benzimidazol que contiene un fragmento carbohidrato unido a través de un anillo de 1,2,3-triazol como conector. El ligante bidentado utilizado se preparó mediante una reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por cobre (I) (CuAAC) entre el *N*-propargil 2-(2'-piridil)benzimidazol y la 3-desoxi-3-azido-1,2:5,6-di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa empleando un sistema CuI/DIPEA/EtOH:H₂O y calentamiento por microondas. Posteriormente, el complejo de paladio (II) preparado se purificó y caracterizó por RMN ¹H y ¹³C así como espectrometría de masas. Finalmente se realizaron estudios de docking molecular y evaluación biológica del complejo de paladio (II) y su correspondiente ligante para evaluar su posible uso como inhibidores de la enzima α -glucosidasa.

ABSTRACT

In this work, the synthesis and characterization of a new palladium (II) complex derived from the bidentate ligand 2-(2'-pyridyl)benzimidazole containing a carbohydrate moiety linked through a 1,2,3-triazole ring as connector is presented. The bidentate ligand used was prepared by a copper (I) catalyzed alkyne-azide cycloaddition reaction (CuAAC) between *N*-propargyl 2-(2'-pyridyl)benzimidazole and 3-deoxy-3-azido-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucopyranose using a CuI/DIPEA/EtOH:H₂O system and microwave heating. Subsequently, the prepared palladium(II) complex was purified and characterized by ¹H and ¹³C NMR as well as two-dimensional experiments. Finally, molecular docking studies and biological evaluation of the palladium (II) complex and its corresponding ligand were carried out to evaluate their possible use as inhibitors of the α -glucosidase enzyme.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un estado fisiológico hiperglucémico. Hay dos principales variantes de diabetes mellitus; la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2). La DM1 es causada por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas, produciendo una disminución de la insulina endógena. La DM2 es la más forma común de DM; su mecanismo fisiopatológico impulsor es la resistencia a la insulina con una compensación inadecuada de la secreción de esta (Madariaga-Mazón et al., 2021). La hiperglucemia crónica causa varias complicaciones potencialmente mortales, como retinopatía, nefropatía, y neuropatía. Las principales complicaciones incluyen aceleración enfermedades cardiovasculares que conducen a infarto de miocardio y enfermedad cerebrovascular (Forbes 2013). El tratamiento de la diabetes mellitus está dirigido a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y la prevención de complicaciones agudas y crónicas. Las estrategias de tratamiento se dividen en no farmacológicas como la dieta y el ejercicio y las farmacológicas en las que se incluyen los antidiabéticos orales e insulina. Dentro del grupo de los antidiabéticos orales, los inhibidores de glucosidasas intestinales resaltan por su versatilidad (Joshi et al., 2015). Las enzimas glucosidasas catalizan la hidrólisis del almidón y carbohidratos para la formación de azúcares simples. Estas enzimas actúan sobre los carbohidratos, disacáridos y cadenas de almidón más cortas permitiendo la digestión de carbohidratos y almidones que se degradan a glucosa, la cual puede ser absorbida en el tracto intestinal. Debido a su naturaleza, este proceso conduce a un aumento en los niveles de glucosa en la sangre. La inhibición en estas enzimas resulta ser fundamental en pacientes que padecen DM2 ya que trabajan en el retraso de la absorción de carbohidratos en el tracto intestinal y, por ende, controlan la hiperglucemia posprandial. Uno de los procesos más estudiados es la inhibición específica de la α -glucosidasa para la cual ya existen en la actualidad fármacos comerciales que inhiben su actividad tales como la acarbosa, el miglitol y la vogliobosa (Figura 1).

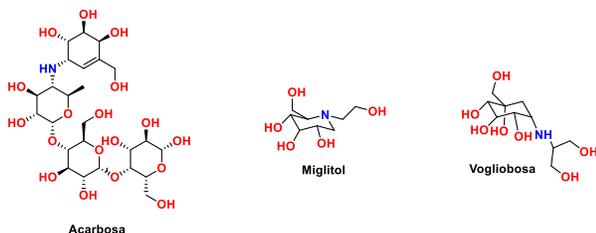


Figura 1. Ejemplos de fármacos comerciales empleados como inhibidores de la α -glucosidasa.

Dada la importancia de los inhibidores de α -glucosidasa, en la actualidad se continua con la búsqueda de nuevas moléculas que resulten más efectivas y selectivas en la inhibición de este tipo de enzimas. Dentro de la gran variedad de inhibidores que han sido reportados, resulta de nuestro interés aquellos inhibidores basados en 1,2,3-triazoles. En este sentido, recientemente se ha informado la síntesis y uso de triazol carbohidratos como inhibidores de la α -glucosidasa (Zi-Pei et al., 2020). Sin embargo, a la fecha son pocos los estudios de complejos metálicos que se han empleado para la inhibición de estas enzimas, aunque se ha reportado que varios iones metálicos y sus complejos exhiben diversas actividades biológicas, incluidos los efectos antidiabéticos (Ueda et al., 2005). Se conoce que algunos complejos de Pd(II)-hidrazida se han utilizado como inhibidores de la α -glucosidasa, encontrando que la presencia del metal puede potenciar enormemente la actividad de este tipo de compuestos (Qurrat et al., 2017), ver figura 2.

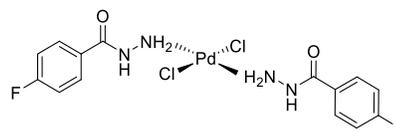


Figura 2. Ejemplo de un complejo de paladio (II) con potente actividad inhibitoria de α -glucosidasa.

Se conoce que algunos derivados de carbohidratos y triazol pueden actuar como potentes inhibidores de la enzima α -glucosidasa, y que además existen reportes de la inhibición de esta enzima con complejos de paladio (II), este trabajo se centra en la preparación de un nuevo complejo de paladio (II) derivado de un ligante 2-(2-piridil)benzimidazol que contienen un fragmento carbohidrato-triazol y un estudio de sus posible actividad como inhibidor de esta enzima.

Metodología

Síntesis

Todos los reactivos se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Se utilizó gel de sílice Merck (tipo 60, 0,063-0,200 mm) para la cromatografía en columna. Los puntos de fusión se obtuvieron en un aparato Fisher-Johns y están sin corregir. Los espectros de RMN se realizaron en espectrómetro Bruker Avance DMX-500 (500 MHz) en cloroformo deuterado (CDCl_3) y los desplazamientos químicos se dan en ppm con TMS como referencia.

Los experimentos de irradiación de microondas se realizaron usando un microondas Anton Paar Monowave 400.

La espectrometría de masas se realizó utilizando el equipo Micro-TOF II Bruker Daltonics GmbH utilizando la técnica de ionización por electrospray (ESI).

Síntesis de la 3-azido-1,2:5,6-di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (3)

Se disolvió la 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (503 mg, 1.93 mmol) en DCM (20 mL) y piridina (1 ml), la mezcla de reacción se llevó a -10°C . Posteriormente, bajo atmósfera inerte, se añadió anhídrido trifílico (1.4 ml, 8.34 mmol) y se dejó en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizó la extracción con HCl al 5% y la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , obteniendo un sólido naranja. Éste triflato intermediario **4** se disolvió en DMF (25ml) y posteriormente se adicionó azida de sodio (NaN_3) (9.84 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres extracciones con acetato de etilo y agua, posteriormente, la fase orgánica se lavó con solución saturada de cloruro de sodio. Finalmente, se purificó el producto crudo en cromatografía por columna, empleando una mezcla de hexano y acetato de etilo (90:10).

Síntesis del 1-propargil-2-piridil-benzimidazol (5)

A una suspensión agitada de hidruro de sodio (2,4 mmol) en anhídrido THF (5 ml), una solución de 2-piridil-benzimidazol (0,390 g, 2 mmol) en THF anhídrido (5 ml) gota a gota a 0°C . La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. A esta suspensión, se añadió bromuro de propargilo (3,0 mmol, 1,5 equiv.) y se dejó para revolver durante la noche. La mezcla de reacción en agitación toda la noche.

Después de este tiempo la reacción se paró por la adición de metanol y la mezcla se evaporó a sequedad. El residuo se extrajo con CH_2Cl_2 (25 ml) y la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 .

El disolvente se eliminó a presión reducida, y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna de sílice utilizando una mezcla de hexano-etilo (9:1).

Síntesis de triazol (6)

El alquino terminal **5** (1,39 mmol) y la glucosilazida **3** (1,39 mmol) se suspendieron en una mezcla 2:1 de acetona y agua (8 ml). A esto solución se agregó ascorbato de sodio (0,05 g, 0,2 mmol) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g, 0,09 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Al termino de este tiempo, la mezcla de reacción se inactivó con solución saturada de NH_4Cl y luego se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 5 ml).

La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y el disolvente se eliminó al vacío y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo. Sólido blanco, 61%. Pf: $155-157^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.68 (ddd, $J = 4.8, 1.8, 0.9$ Hz, 1H), 8.46 (dt, $J = 8.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.88 (ddd, $J = 8.0, 7.6, 1.8$ Hz, 1H), 7.81 – 7.79 (m, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.76 – 7.74 (m, 1H), 6.26 – 6.09 (m, 1H), 5.89 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.02 (dd, $J = 9.7, 4.7$ Hz, 1H), 4.87 – 4.70 (m, 1H), 4.15 (ddd, $J = 9.7, 6.2, 0.4$ Hz, 1H), 4.08 (td, $J = 6.3, 5.1$ Hz, 1H), 3.90 (dd, $J = 8.9, 6.4$ Hz, 1H), 3.57 (dd, $J = 8.9, 5.1$ Hz, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.74 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 150.9, 149.0, 148.2, 143.8, 142.1, 137.0, 135.9, 124.9, 124.0, 122.8, 122.4, 120.8, 112.3, 11.4, 109.7, 102.0, 82.7, 80.9, 77.6, 66.7, 66.1, 42.1, 26.6, 26.5, 25.6, 24.6.

Síntesis del complejo (7)

En un matraz de 50 mL se colocó el correspondiente ligante **5** (1 mmol) y disolvió en 15 mL de tetrahidrofurano anhídrido (THF) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. A dicha disolución se adicionó cloruro de paladio (II) (1 mmol). Una vez que se añadió la sal metálica, el color de la mezcla de reacción cambió inmediatamente a amarillo. La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 2 h. Luego este tiempo, se agregaron 25 mL de n-hexano a la mezcla para precipitar el crudo el cual se filtró y lavó con THF para eliminar el ligante que no reaccionó. El sólido resultante redisolvió en CH_2Cl_2 (5 mL) y luego se precipitó con éter dietílico (10 mL), se filtró y seco al vacío para dar el complejo como un sólido amarillo-naranja. Sólido amarillo-naranja, 85 %. Pf: $268-270^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.07 (dd, $J = 5.7, 1.0$ Hz, 1H), 8.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.52 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.34 (s, 2H), 8.30 (td, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.74 (ddd, $J = 7.6, 5.7, 1.3$ Hz, 1H), 7.45 (ddd, $J = 8.4, 7.1, 1.1$ Hz, 1H), 7.33 (ddd, $J = 8.3, 7.1, 1.1$ Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 5.87 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.15 (dd, $J = 9.7, 5.1$ Hz, 1H), 4.76 (dd, $J = 5.1, 3.7$ Hz, 1H), 4.42 (dd, $J = 9.7, 6.0$ Hz, 1H), 4.07 (td, $J = 6.4, 5.0$ Hz, 1H), 3.85 (dd, $J = 8.8, 6.7$ Hz, 1H), 3.44 (dd, $J = 8.8, 4.9$ Hz, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.75 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO) δ 150.8, 146.4, 141.0, 140.5, 139.2, 134.7, 127.2, 125.7, 125.2, 124.6, 118.9, 112.3, 112.2, 108.8, 104.2, 78.8, 77.2, 75.3, 65.5, 62.5, 41.1, 26.2, 26.1, 25.6, 24.6.

Ensayo de actividad inhibitoria de α -glucosidasa

Los compuestos se disolvieron en DMSO al 50%, solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 100 mM, pH = 7).

Se incubaron alícuotas de 0–10 μL de los compuestos de prueba (por triplicado) durante 10 min con 20 μL de una solución enzimática de α -glucosidasa de levadura (Sigma-Aldrich, 0,4 unidades/mL en PBS). Después de la incubación con las enzimas, se adicionaron 10 μL de *p*-nitrofenil α -D-glucopiranosido y luego se incubaron durante 20 min a 37 °C. Posteriormente, las absorbancias se determinaron en un lector de microplacas BIO-RAD modelo 680 a 405 nm.

Estudios de acoplamiento molecular

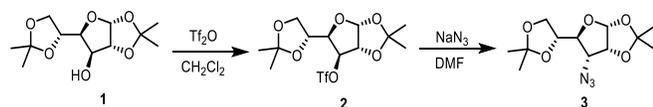
Los estudios de acoplamiento se realizaron utilizando el programa AUTODOCK 4.2 y la estructura pdb de 3A4A se tomó de la base de datos de proteínas de Brookhaven (<http://www.rcsb.org>). Posteriormente, las moléculas de agua y ligandos externos se eliminaron de la estructura de la proteína.

La estructura 3D de los compuestos se realizó utilizando Chem 3D 16.0 y se optimizó la geometría utilizando el programa Avogadro. Después de la preparación del formato autodock de proteína y compuestos seleccionados. El centro del cuadro de la cuadrícula se colocó en las coordenadas $x = 22.6225$, $y = -8.069$, $z = 24.158$ y, las dimensiones del cuadro de sitio activo se establecieron en $50 \times 50 \times 50$ con un espaciamiento de 0.375\AA . Finalmente, los resultados se visualizaron mediante Discovery Client Studio.

Resultados y discusión

Previo a la formación del complejo de paladio (II), fue necesario sintetizar y caracterizar el nuevo ligante de 2-(2-piridil)benzimidazol que contienen un fragmento carbohidrato-triazol. En primer lugar, se preparó la glucosilazida derivada de la glucofuranosa.

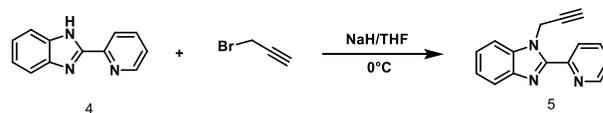
Para la obtención de dicha glucosilazida, la glucofuranosa **1** se triflo con anhídrido trifluorometansulfónico para obtener el correspondiente triflato **2**, el cual se hizo reaccionar posteriormente con azida de sodio para obtener la azida **3** como un aceite amarillo claro en un 43 % de rendimiento después de su purificación por cromatografía en columna (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de la 3-azida-1,2:5,6-diisopropiliden- α -D-glucofuranosa **3**.

Una vez preparada la glucosil azida, el siguiente paso fue obtener el 1-propargil-2-piridil-benzimidazol **5** a partir de 2-piridil-benzimidazol **4** y bromuro de propargilo en presencia de NaH y THF como disolvente a 0°C. Con estas

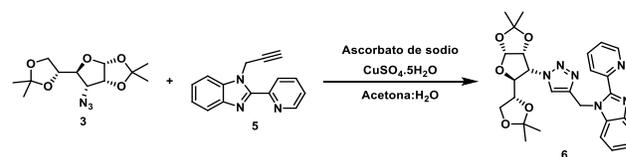
condiciones fue posible aislar el alquino terminal **5** como un sólido blanco en un 85% (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de 1-propargil-2-piridil-benzimidazol **5**.

Una vez que se ha obtenido los componentes necesarios para llevar a cabo la formación del ligante, se realizó una reacción de cicloadición [3+2] alquino-azida catalizada por Cu(I) (CuAAC) entre la glucosil azida **3** y el alquino termina **5** empleando un sistema $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato de sodio/acetona: H_2O a temperatura ambiente.

Después de 18 horas de reacción y su correspondiente purificación por cromatografía en columna, fue posible de manera regioselectiva el 1,2,3-triazol **6** como un sólido blanco en un 61 % (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis del 1,2,3-triazol **6**.

Este triazol fue caracterizado por RMN de ^1H y ^{13}C y su espectro de RMN- ^1H se muestra en la figura 1.

El espectro de la figura 3 muestra claramente la presencia del carbohidrato por las 3 señales intensas que aparecen en la zona de protones alifáticos, el fragmento de 2-piridil-benzimidazol como un juego de 7 señales en la zona aromática, además de que la estructura puede confirmarse completamente por la presencia de una señal simple en 7.79 ppm correspondiente al hidrógeno del anillo de triazol.

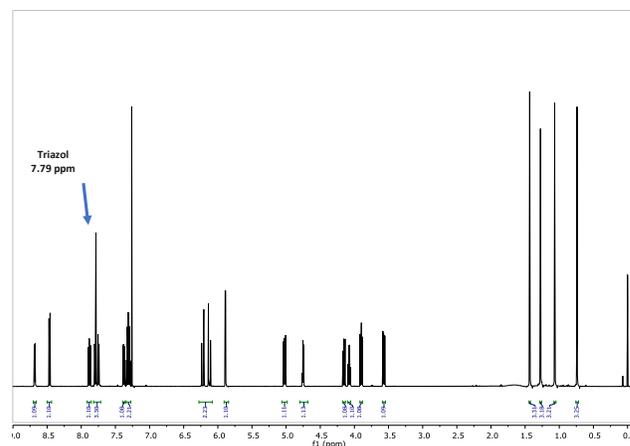


Figura 3. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3) del triazol **6**.

Para el compuesto **6**, el análisis del acoplamiento molecular revela que el fragmento carbohidrato del ligante se encuentra localizado en el bolsillo hidrofóbico (hydrophobic pocket) que se encuentra delimitado por Phe159, Phe303 y Arg444 y formando una interacción CH- π con Phe178, mientras que el fragmento de 2-piridil-2-benzimidazol se rodea de los residuos Lys156, Tyr158 y Arg305 también a través de interacciones CH- π . Además, el fragmento del anillo de 1,2,3-triazol muestra una interacción de apilamiento π - π con el aminoácido Tyr158. Estas interacciones ayudan al ligante **6** a anclarse al sitio activo de la α -glucosidasa. Por otro lado, para el complejo **7** muestra casi las mismas interacciones que su precursor **6**, donde la única diferencia primordial es que el fragmento de 2-piridil-2-benzimidazol forma algunas interacciones CH- π adicionales. La energía de afinidad para **6** encontrada fue de -7.6 kcal/mol mientras que para **7** es de -7.9 Kcal/mol, lo que está relacionado con los resultados experimentales. A manera de ejemplo, la figura 6 se muestra el modo de unión teórico entre **6** y α -glucosidasa.

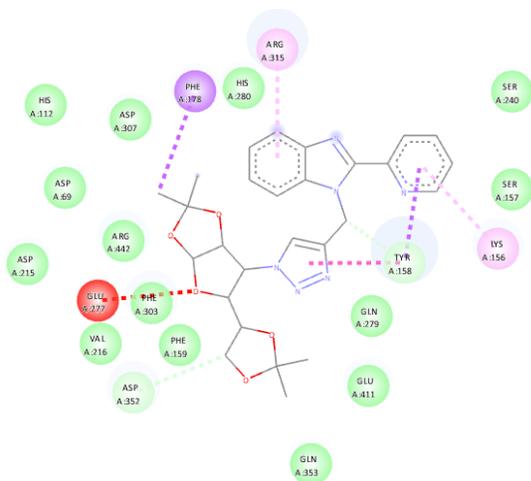


Figura 6. Representación 2D de las interacciones de **6** con la α -glucosidasa de levadura.

Conclusiones

Se sintetizó un nuevo complejo de paladio (II) derivado del ligante bidentado 2-(2'-piridil)benzimidazol que contiene un fragmento carbohidrato unido a través de un anillo de 1,2,3-triazol como conector en buenos rendimientos. Se determinó la actividad biológica tanto del complejo como su correspondiente ligante en un ensayo de actividad inhibitoria de α -glucosidasa de levadura encontrando que ambos compuestos muestran escasa actividad inhibitoria.

A través del acoplamiento molecular, se determinó el modo de unión teórico de los compuestos encontrando que ambos compuestos muestran una energía de afinidad similar al sitio de unión de la enzima.

Agradecimientos

A los laboratorios de Resonancia Magnética Nuclear, Difracción de rayos X de polvos y Espectrometría de masas de la UAM-Iztapalapa.

Referencias

- Forbes, J. M., Cooper M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.*, 93, 137-188.
- Joshi, S. R., Standl, E. Tong, N. Shah, P, Kalra, S. Rathod, R. (2015). Therapeutic potential of alpha-glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: An evidence-based review. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 1959-1981.
- Madariaga-Mazón A., Naveja, J.J., Medina-Franco, J.L., Noriega-Colima K.O., Martinez-Mayorga K. (2021). DiaNat-DB: a molecular database of antidiabetic compounds from medicinal plants. *RSC Adv.*, 11, 5172-5178.
- Qurrat-ul-Ain, Ashiq, U., Jamal, R.A., Mohammad, S., Mahroof-Tahir (2017). Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes, *Arab. J. Chem.*, 10, 488-499.
- Ueda, E., Yoshikawa, Y., Sakurai, H., Kojima, Y., Kajiwar, M.N. (2005). In vitro alpha-glucosidase inhibitory effect of Zn(II) complex with 6-methyl-2-picolinmethylamide *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 451-452.
- Zi-Pei, Z., Wan-Ying, X. Jian-Xing, H., De-Cai, X., Yan-Fen, W., Xin-Shan. Y. (2020). Novel carbohydrate-triazole derivatives as potential α -glucosidase inhibitors. *Chin. J. Nat. Med.* 18, 729-737.