

**UNIVERSIDAD DE CHILE**



**REGIOSELECTIVIDAD EN EL ACOPLAMIENTO OXIDATIVO C-N  
DE QUINONAS CON AMINAS Y SU UTILIZACIÓN EN LA  
OBTENCIÓN DE INHIBIDORES DE FOSFATASA Cdc25B E  
INHIBIDORES DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS  
CANCEROSAS**

**TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA  
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN QUÍMICA POR**

**MAXIMILIANO ALEXANDER MARTÍNEZ CIFUENTES**

**Director: Prof. Ramiro Araya Maturana**

**Santiago de Chile**

**Septiembre de 2013**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

## INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la comisión de postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

### **MAXIMILIANO ALEXANDER MARTÍNEZ CIFUENTES**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido en fecha

.....

#### **Director de Tesis:**

Dr. Ramiro Araya Maturana

.....

#### **Comisión Informante de Tesis:**

Dra. Maria Cecília Rojas

.....

Dr. Fernando Mendizábal

.....

Dr. David Pessoa

.....

Dr. Patricio Iturriaga

.....

---

*Dedicado a mis queridos padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

A las personas que conformaron la comisión de evaluación de esta tesis, por su buena disposición y sus valiosas correcciones.

A CONICYT por la beca de doctorado N° 21090023 y la Beca Chile de Pasantía Doctoral N° 75120034, y al proyecto FONDECYT N° 1110176.

A todos quienes, de uno forma u otra, colaboraron para desarrollar este trabajo, especialmente a mi director, profesor Ramiro Araya, por su confianza y constante apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>X</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. ENZIMAS FOSFATASAS COMO BLANCO FARMACOLÓGICO	2
1.1.1. QUINONAS COMO INHIBIDORES DE LAS CDC25	7
1.2. MITOCONDRIA COMO BLANCO FARMACOLÓGICO DE QUINONAS	10
1.3. ASPECTOS GENERALES DE LAS QUINONAS	15
1.3.1. AMINOQUINONAS	25
1.3.2. PROPIEDADES DE LAS QUINONAS	28
1.4. QUÍMICA VERDE	31
1.4.1. EL AGUA COMO MEDIO DE REACCIÓN SUSTENTABLE	33
1.4.2. EFECTOS DEL AGUA SOBRE LAS REACCIONES ORGÁNICAS	35
1.5. QUÍMICA TEÓRICA	39
1.5.1. MECÁNICA CUÁNTICA	39
1.5.2. MÉTODOS DE CÁLCULOS	41
1.5.3. MÉTODO DE LA TEORÍA DE LOS FUNCIONALES DE LA DENSIDAD (DFT)	49
1.5.4. ESTIMACIÓN TEÓRICA DE LA REACTIVIDAD	55
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>61</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>63</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
4.1. ESTUDIO DE REACTIVIDAD DE AMINAS FRENTE A QUINONAS	66
4.1.1. PROPIEDADES GLOBALES Y LOCALES	71
4.1.2. POTENCIAL ELECTROSTÁTICO MOLECULAR	76
4.1.3. USO DE LA METODOLOGÍA EN AGUA PARA OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE AMINOQUINONAS	79
4.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS AMINOQUINONAS	81

4.2.1.	INHIBIDORES DE LA ENZIMA FOSFATASA Cdc25B	81
4.2.2.	CÁLCULOS DE DOCKING MOLECULAR	84
4.2.3.	INHIBIDORES DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	88
4.2.4.	EFFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	89
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>METODOLOGÍAS</b>	<b>94</b>
<b>6.1.</b>	<b>METODOLOGÍA BIOQUÍMICA</b>	<b>95</b>
6.1.1.	INHIBICIÓN ENZIMÁTICA	95
6.1.2.	PROPAGACIÓN Y OBTENCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES TA3	95
6.1.3.	PREPARACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS Y DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	96
6.1.4.	CULTIVO CELULAR	97
<b>6.2.</b>	<b>METODOLOGÍA COMPUTACIONAL</b>	<b>97</b>
<b>6.3.</b>	<b>METODOLOGÍA SINTÉTICA</b>	<b>98</b>
6.3.1.	PROCEDIMIENTO GENERAL SINTÉTICO	98
<b>6.4.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS</b>	<b>100</b>
6.4.1.	2-METIL-5-(4-FENIL-PIPERAZIN-1-IL)-[1,4]BENZOQUINONA (VI)	100
6.4.2.	2-METIL-6-(4-FENIL-PIPERAZIN-1-IL)-[1,4]BENZOQUINONA (VII)	100
6.4.3.	3,5-DIANILIN-2-METILBENZO-1,4-QUINONA (X)	101
6.4.4.	8,8-DIMETIL-3-(4-FENILPIPERAZIN-1-IL)NAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XII)	101
6.4.5.	3-ANILIN-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XIV)	102
6.4.6.	2-ANILIN-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XV)	102
6.4.7.	3-(P-TOLUIDIN)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>A</sub> )	103
6.4.8.	3-(O-TOLUIDIN)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>B</sub> )	103
6.4.9.	3-(P-CLOROFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>C</sub> )	104
6.4.10.	3-(M-CLOROFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>D</sub> )	104
6.4.11.	3-(O-CLOROFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>E</sub> )	105
6.4.12.	3-(O-BROMOFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>F</sub> )	105
6.4.13.	3-(P-BROMOFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>G</sub> )	106
6.4.14.	3-(3,4-DICLOROFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>H</sub> )	106
6.4.15.	3-(P-METOXIFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>I</sub> )	107
6.4.16.	3-(3,4-DIMETOXIFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>J</sub> )	107
6.4.17.	3-(P-ACETILFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XX <sub>K</sub> )	108

6.4.18.	3-(O-ACETILFENILAMINO)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XXL)	108
6.4.19.	4-(5,5-DIMETIL-1,4,8-TRIOXO-1,4,5,8-TETRAHIDRONAFTALEN-2-ILAMINO)BENZOATO DE ETILO (XX <sub>M</sub> )	109
6.4.20.	2-(5,5-DIMETIL-1,4,8-TRIOXO-1,4,5,8-TETRAHIDRONAFTALEN-2-YLAMINO)BENZOATO DE ETILO (XX <sub>N</sub> )	109
6.4.21.	3-(4-(2-METOXIFENIL)PIPERAZIN-1-IL)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XXI <sub>A</sub> )	110
6.4.22.	3-(4-(3-METOXIFENIL)PIPERAZIN-1-IL)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XXI <sub>B</sub> )	110
6.4.23.	3-(4-(2-FLUOROFENIL)PIPERAZIN-1-IL)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XXI <sub>C</sub> )	111
6.4.24.	3-(4-(4-FLUOROFENIL)PIPERAZIN-1-IL)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XXI <sub>D</sub> )	111
6.4.25.	3-(4-(4-NITROFENIL)PIPERAZIN-1-IL)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XXI <sub>E</sub> )	112
6.4.26.	3-(4-(PIRIDIN-2-IL)PIPERAZIN-1-YL)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XXI <sub>F</sub> )	112
6.4.27.	3-(4-(3,4-DICLOROFENIL)PIPERAZIN-1-IL)-8,8-DIMETILNAFTALEN-1,4,5(8H)-TRIONA (XXI <sub>G</sub> )	113
6.4.28.	3-(BIFENIL-4-ILAMINO)-8,8-DIMETILNAPHTHALENE-1,4,5(8H)-TRIONA (XXII)	113
<b>7.</b>	<b><u>ANEXO</u></b>	<b>114</b>
7.1.	ANILINQUINONAS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS	115

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular .....	2
Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de la enzima Cdc25B .....	6
Figura 3. Posibles estados de protonación del sustrato de la enzima Cdc25B.....	7
Figura 4. Quinonas NSC663284 y JUN-1111, inhibidores de las enzimas Cdc25.....	8
Figura 5. Quinonas de origen natural, Caulibugulonas A-E, con actividad inhibitoria de la enzima Cdc2B. ....	9
Figura 6. Estructura de quinona identificada como inhibidor de Cdc25B a través de screening virtual. ....	9
Figura 7. Inhibidores mitocondriales: Rotenona complejo I, Vitamina E complejo II y Antimicina A complejo III.....	13
Figura 8. Mitoquinona un análogo a ubiquinona con capacidad protectora frente a lipoperoxidación lipídica en mitocondrias. ....	14
Figura 9. Quinonas sulfo-oxo y sulfo-aza sustituidas.....	15
Figura 10. Vitamina K1 .....	16
Figura 11. Estructura de las ubiquinonas (n = 6-10) .....	16
Figura 12. Estructura de las plastoquinonas (n = 6 -10) .....	17
Figura 13. Marmicina A con actividad anti-cáncer. ....	18
Figura 14. <i>Diaziridilquinonas</i> que actúan como agentes alquilantes de ADN. ....	18
Figura 15. Compuestos derivados de la <i>Cannabis Sativa</i> con actividad antitumoral. ....	19
Figura 16. Atovaquona, una droga antiparasitaria. ....	20
Figura 17. Sesquiterpenquinonas de origen natural. ....	21
Figura 18. Quinonas diterpenicas de origen natural. ....	21
Figura 19. Algunas hidroquinonas sintetizadas anteriormente en nuestro laboratorio, que presentan actividad antitumoral. ....	22
Figura 20. Quinona sintetizada anteriormente en nuestro laboratorio con efecto en el crecimiento micelial de la cepa G29 de la <i>B. Cinerea</i> . ....	22
Figura 21. Ciclaje redox de quinonas. ....	23
Figura 22. (A) adición oxidativa, (B) sustitución nucleofílica en quinonas. ....	25
Figura 23. Aminoquinonas de origen natural. ....	26
Figura 24. Adición oxidativa catalizada por $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	27
Figura 25. Regioselectividad en adición oxidativa catalizada por $\text{CeCl}_3$ . ....	28
Figura 27. Anilín derivados de <i>p</i> -naftoquinona. ....	29
Figura 28. Estructura de furanamino-naftoquinonas antitumorales.....	31
Figura 28. Adición oxidativa de tioles sobre quinonas en agua. ....	31
Figura 29. Agregados hidrofóbicos pequeños en agua. ....	36
Figura 30. Agregados hidrofóbicos grandes .....	38
Figura 31. Compuestos usados en este trabajo. ....	67
Figura 32. Geometría optimizada de los productos de la mono-adición de anilina y la quinona I .....	72
Figura 33. MEP de la quinona I, los productos de la mono-adición con anilina y sus complejos con agua.....	77
Figura 34. MEP de la quinona II y sus complejos con agua.....	78
Figura 35. MEP de la quinona III y sus complejo con agua.....	79
Figura 36. Inhibidores de la enzima Cdc2B NSC-95397 y Cpd-5. ....	81
Figura 37. Estructura hipotética para potenciales inhibidores de la enzima Cdc25B .....	81
Figura 38. Ilustración con las dos mejores conformaciones (A y B) del compuesto II en el sitio catalítico y en un segundo sitio de la Cdc25B. ....	85
Figura 39. Interacciones del compuesto II en el sitio catalítico de la enzima (A) y en un segundo sitio de unión (B) .....	86
Figura 40. Modo de unión de las quinona XII en el sitio activo de la enzima Cdc25B.....	87
Figura 41. Anilinpírimidinas. ....	116
Figura 42. Efecto del compuesto XXg a 2, 4, 8 y 16 ppm sobre el consumo de oxígeno de esporas de la cepa B05.10. Controles: Solvente (Acetona), CCCP 0,05mM (Carbonilcianuro- <i>m</i> -clorofenilhidrazona) y KCN 10mM, un desacoplador y un inhibidor de la cadena transportadora de electrones, respectivamente. .	119



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados para la reacción de la quinona I y la amina IV <sub>a</sub> .....	69
Tabla 2. Resultados para la reacción de la quinona I y la amina V <sub>a</sub> .....	69
Tabla 3. Resultados para la reacción de la quinona II y la amina IV <sub>a</sub> .....	70
Tabla 4. Resultados para la reacción de la quinona II y la amina V <sub>a</sub> .....	70
Tabla 5. Resultados para la reacción de la quinona III con derivados de anilina. ....	71
Tabla 6. Electrofilia global y local para la quinona I y su complejo con agua Ia. ....	72
Tabla 7. Resultados de las electrofilias de los productos de la mono-adición de anilina con la quinona I y sus complejos con agua. ....	73
Tabla 8. Electrofilias de la quinona II y sus complejos con agua. ....	74
Tabla 9. Electrofilia global y local de la quinona III y su complejo con agua.....	75
Tabla 10. Nucleofilia de las aminas IV <sub>a</sub> , V <sub>a</sub> y sus complejos con agua.....	75
Tabla 11. Rendimiento de la síntesis de derivados de aminoquinonas sustituidas de la quinona II, obtenidas en agua. ....	80
Tabla 12. Efecto de las quinonas sobre la inhibición enzimática de la enzima Cdc25B. ....	84
Tabla 13. Efecto de las quinonas sobre la respiración mitocondrial de mitocondrias aisladas de células TA3.88	
Tabla 14. IC <sub>50</sub> de algunas anilin-quinonas, la quinona II y la quinona NSC95397 sobre la proliferación celular de células mamarias de ratón TA3 (cáncer), MM3MG (no malignas) y células mamarias humanas MCF7 (cáncer) y HME1 (no malignas). ....	89
Tabla 15. IC <sub>50</sub> de algunas fenilpiperzín-quinonas sobre la proliferación celular de células mamarias de ratón TA3 (cáncer) y MM3MG (no malignas). ....	90
Tabla 16. Efecto de algunas anilin-quinonas sobre el crecimiento micelial de las cepas U29 y B05.10 de <i>B. cinérea</i> , así como la cepa mutante ΔB05.10 que no expresa la bomba de expulsión ABC. ....	117

## Resumen

En esta tesis doctoral se estudió, en forma experimental y teórica, la reacción de acoplamiento oxidativo de las quinonas carbo- y heterocíclicas 2-metil-1,4-benzoquinona, 8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8*H*)-triona y el éster metílico del ácido 1,3-dimetil-5,8-dioxo-5,8-dihidro-isoquinolin-4-carboxílico (una isoquinolin quinona), con aminas alifáticas (derivados de *N*-fenilpiperazina) y aromáticas (derivados de anilina), comparando un medio de reacción orgánico como el diclorometano con un medio de reacción sustentable como el agua. Se aplicó la metodología sintética desarrollada en la obtención de nuevos inhibidores de la enzima fosfatasa Cdc25B, implicada en el control de la proliferación celular y asociada con cáncer. Los compuestos fueron también estudiados como inhibidores de la respiración mitocondrial, un blanco donde comúnmente actúan compuestos quinónicos, además de su efecto antiproliferativo en células tumorales de ratón y humanas.

Se encontró que el medio acuoso puede incrementar tanto la reactividad como la regioselectividad, en las reacciones de acoplamiento C-N de aminas con quinonas. Para los casos estudiados en este trabajo, las reacciones en agua dan mejores, o al menos, los mismos resultados que al usar un medio de reacción convencional como diclorometano. Los cálculos teóricos, basados en índices de reactividad DFT y el potencial electrostático molecular ayudaron a racionalizar los cambios en la reactividad observada experimentalmente.

A partir de la quinona 8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8*H*)-triona, se obtuvieron nuevos inhibidores de la enzima Cdc25B de tipo aminiquinónicos, los cuales presentaron inhibición de tipo mixta, con  $K_i$  y  $K_i'$  en el rango micromolar y en un caso con  $K_i'$  submicromolar. Los cálculos de docking permitieron visualizar la forma de unión de los compuestos en el sitio activo de la enzima, lo que explica en parte la acción inhibitoria de

los compuestos. Los resultados de la inhibición de la respiración mitocondrial mostraron que la adición de un sustituyente amino, ya sea anilina, fenilpiperazina o bisfenilamina en la quinona 8,8-dimetolnaftalen-1,4,5(8*H*)-triona inactiva su acción. Los resultados de inhibición de la proliferación celular de las aminoquinonas obtenidas, mostraron que para el caso de las células de ratón la relación de proliferación de células cancerosas/células normales es siempre mayor a uno, indicando una selectividad por las células cancerosas, en cambio en las células humanas esta relación se invirtió, siendo siempre las células normales más susceptibles que las cancerosas. El compuesto más activo frente a las células tumorales de ratón TA3 fue la *o*-acetil anilinquinona (1,29  $\mu$ M), mientras que frente a las células tumorales humanas MCF7 el compuesto más activo fue la *o*-cloro anilinquinona (18,67  $\mu$ M).

## Summary

The oxidative coupling reactions of carbo- and heterocyclic quinones 2-methyl-1,4-benzoquinone, 8,8-dimethylnaphthalene-1,4,5(8*H*)-trione and the methyl ester of 1,3-dimethyl-5,8-dioxo-5,8-dihydro-isoquinoline-4-carboxylic acid with aliphatic amines (*N*-phenylpiperazine derivatives) and aromatic (aniline derivatives) were studied experimentally and theoretically. A comparison between a typical organic solvent such as dichloromethane and water, a sustainable reaction medium, was performed. The developed synthetic methodology was applied in the synthesis of new inhibitors of Cdc25B phosphatase enzyme, which is involved in the control of cell proliferation and therefore proposed as a target in cancer research. The inhibition of mitochondrial respiration and the antiproliferative effects in mouse and human tumor cells provoked by the series of compounds were also studied.

The results of these studies show that water enhance both reactivity and regioselectivity, in the coupling C-N reactions of quinones with amines. The experimental changes in reactivity were explained by theoretical calculations based on DFT reactivity indexes and molecular electrostatic potential.

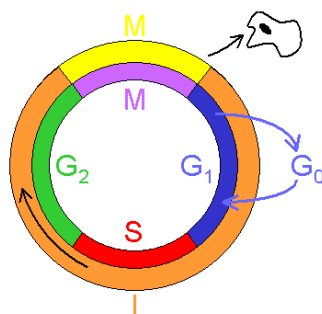
Starting from 8,8-dimethylnaphthalen-1,4,5(8*H*)-trione, new aminoquinone Cdc25B enzyme inhibitors were obtained. These compounds showed inhibition of mixed type, with  $K_i$  and  $K_i'$  in the micromolar range and in one case with  $K_i'$  submicromolar. Docking calculations showed the binding of compounds in the active site of the enzyme, explaining partially their inhibitory action. The results on mitochondrial respiration showed that the addition of an amino substituent, either aniline, bisphenilamine or phenylpiperazine to 8,8-dimethylnaphthalen-1,4,5(8*H*)-trione inactivate its inhibitory activity. For the case of mouse cells the results on cell proliferation showed that, the ratio of inhibition of proliferation of

cancer versus normal cells is always greater than one. This indicates selectivity for cancer cells. The opposite is observed in human cells. The most active compound against tumor cells mouse TA3 was *o*-acetyl anilinoquinone (1.29  $\mu\text{M}$  ) while facing MCF7 human tumor cells the most active compound was *o*-chloro anilinoquinone (18.67  $\mu\text{M}$ ).

# **1. Introducción**

## 1.1. Enzimas Fosfatasa como blanco farmacológico

Una fosfatasa es una enzima que remueve, mediante hidrólisis, grupos fosfatos presentes en dichos sustratos. Esta acción es opuesta a la de las quinasas, las cuales catalizan su fosforilación. Las fosfatasa que desfosforilan residuos aminoacídicos de proteínas, se clasifican comúnmente en 3 tipos: fosfatasa específicas de serina/treonina (PS/TP), fosfatasa específicas de tirosina (PTP) y fosfatasa duales (DSP)<sup>1</sup>. Las enzimas Cdc25 (Cell division cycle 25) corresponden a un tipo de fosfatasa dual (DSP) que son esenciales en la regulación del ciclo celular. El ciclo celular es un conjunto de procesos que conducen al crecimiento y división celular. Se divide en cuatro etapas llamadas G<sub>1</sub> (*Gap 1*), S (*Synthesis*), G<sub>2</sub> (*Gap 2*) y M (fase M). También existe una fase G<sub>0</sub>, que se encuentra fuera del ciclo celular, donde la célula se encuentra en un estado quieto (conocido como estado quiescente). Las etapas G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> corresponden a la interfase (I), en la cual no ocurre división celular, y la célula realiza funciones específicas para progresar en el ciclo celular (como replicación del ADN). La etapa M corresponde a la fase M, donde ocurre la división celular. En esta etapa ocurre la mitosis (reparto del material genético) y la citocinesis (división del citoplasma).<sup>2</sup>



**Figura 1.** Ciclo celular

<sup>1</sup> Denu, J.M.; Stuckey, J.A.; Saper, M.A.; Dixon, J.E. *Cell* **1996**, 87, 361.

<sup>2</sup> Lodish et al. *Biología celular y molecular*. **2005** 5 ed., Buenos Aires, editorial Médica Panamericana.

Las enzimas Cdc25 desfosforilan y activan quinasas dependientes de ciclina (*cyclin-dependent kinases*, CDK), que controlan la progresión en varios niveles del ciclo celular. Las Cdc25 actúan desfosforilando tanto residuos de tirosina, como de serina o treonina fosforilados, que estén próximos o separados por un aminoácido. Existen tres genes para las Cdc25 en los seres humanos (A, B y C), que codifican para tres proteínas. Aunque se ha avanzado en la caracterización de las fosfatasas Cdc25, algunos aspectos de su funcionamiento y regulación no han sido aún bien establecidos. La Cdc25A está involucrada en el control de la transición G<sub>1</sub>/S por desfosforilación y por lo tanto activación de los complejos CDK2/ciclina E y ciclina A. Se ha encontrado también que está involucrada en el control de la progresión de la mitosis. Las Cdc25B y C regulan principalmente la progresión en la transición G<sub>2</sub>/M y la mitosis. La Cdc25B se acumula desde las fases S tardía a la G temprana, alcanzado un máximo de actividad en la transición G<sub>2</sub>/M. Se ha propuesto que actúa como iniciador para gatillar la mitosis por desfosforilación, activando la CDK1/ciclina B, esta enzima se mueve entre el núcleo y citoplasma. La actividad de la Cdc25C está involucrada en el control de la progresión dentro de la mitosis. Esta activación se correlaciona con la fosforilación de la Cdc25C por su propio sustrato, la CDK1/ciclinaB.<sup>3</sup> Por lo tanto, es posible presumir que las múltiples isoformas Cdc25 cooperen para regular cada transición del ciclo celular y participar en el control de la entrada y la progresión de la mitosis.<sup>4</sup>

Las fosfatasas Cdc25, como reguladores que controlan la transición G<sub>2</sub>/M, juegan un papel central en el punto de control que se activa como respuesta a daños en el ADN, antes que la

---

<sup>3</sup> Ham, S.W.; Carr, B. I. *Drug. Des. Rev* **2004**, 1, 123.

<sup>4</sup> Boutros, R.; Dozier, C.; Ducommun, B.; *Curr. Opin. Cell. Biol* **2006**, 18, 185.



célula divide su material genético en dos células hijas. Luego que se produce daño en el ADN, las fosfatasa son inactivadas a través de varios mecanismos,<sup>5</sup> que llevan a la detención del ciclo celular. Esto se mantiene hasta que el daño es reparado o la célula sufra apoptosis. Se ha demostrado que la Cdc25B, es la única fosfatasa Cdc25 requerida para la recuperación del punto de control, permitiendo la entrada en la fase de mitosis luego de la reparación del ADN.<sup>6</sup>

Dada la importancia de las Cdc25 como reguladores del ciclo celular, han sido ligadas de distintas formas a transformaciones oncogénicas y cáncer en seres humanos. La expresión de la Cdc25B tiene una actividad transformadora en fibroblastos embrionarios de ratón y ratones transgénicos que expresan la Cdc25B en las glándulas mamarias han mostrado un incremento en la susceptibilidad a tumores inducidos por carcinogénesis.<sup>7</sup> Además, se ha reportado en varios tumores humanos, tales como cáncer de mama, adenocarcinoma ductal de páncreas, cáncer de próstata, linfoma no-Hodgkin y cáncer de pulmón de células pequeñas, la sobreexpresión de las fosfatasa Cdc25A y B.<sup>8</sup> En un número importante de casos, se ha observado una correlación entre la sobreexpresión de la Cdc25A o la Cdc25B y un mal pronóstico clínico. Aunque, la sobreexpresión de cualquiera de las dos fosfatasa es suficiente para dirigir la progresión del ciclo celular en células cancerosas, ambas a la vez contribuyen a cánceres más agresivos.<sup>52</sup>

---

<sup>5</sup> outros, R.; Dozier, C.; Ducommun, B.; *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2006**, 18,185.

<sup>6</sup>(a) vanVugt, M.A.T.M.; Bras, A.; Medema, R.H. *Mol. Cell* **2004**, 15, 799. (b) Bugler, B.; Quaranta, M.; Aressy, B.; Brezak, M.-C. ,Prevost, G.; Ducommun, B. *Mol. Cancer. Ther.* **2006**, 5, 1446.

<sup>7</sup> Ma, Z.-Q.; Chua, S.S.; DeMayo, F.J.; Tsai, S.Y.; *Oncogene* **1999**, 18, 4564.

<sup>8</sup> Kristjansdottir, K.; Rudolph, J. ; *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1043.

Se ha descrito que inhibidores de las Cdc25 fueron capaces de reducir el crecimiento de células pancreáticas que sobreexpresan altos niveles de Cdc25B.<sup>9</sup> Aunque las implicaciones del aumento de la expresión de las Cdc25 en la tumorigénesis no han sido completamente clarificadas, la inhibición de estas enzimas puede presentar una interesante aproximación en el tratamiento del cáncer.

El dominio catalítico de las Cdc25 contiene una estructura común a todas las fosfatasa, CX<sub>5</sub>R, donde C es una cisteína catalítica, X<sub>5</sub> corresponden a 5 residuos catalíticos cuyos esqueletos amidicos forman un bolsillo circular para el grupo fosfato, junto con el residuo R, que corresponde a una arginina. La estructura de los dominios catalíticos de las Cdc25A y B ha sido resuelta por cristalografía de rayos X.<sup>10</sup>

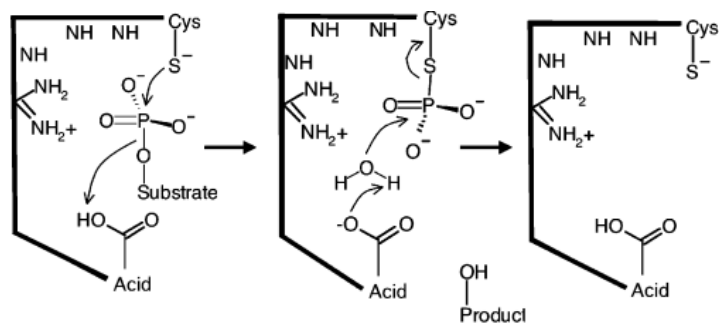
El mecanismo propuesto de hidrólisis en el sitio activo de la enzima Cdc25B (Figura 2) incluye la participación de dos aminoácidos clave, una cisteína y un ácido glutámico o aspártico. La cisteína con un pKa de 5,9, a pH fisiológico (7.4), presenta el grupo tiol desprotonado (como tiolato), que ataca nucleofílicamente al fosforo del sustrato. El ácido aporta su protón para promover la ruptura del enlace fosfoester, mientras el azufre de la cisteína se enlaza con al átomo de fosforo, liberando al sustrato. Posteriormente, una molécula de agua vuelve a protonar al ácido, mientras el hidroxilo resultante se una el fosforo regenerando el grupo fosfato y se libera del azufre de la cisteína. Existen dudas si el ácido corresponde a un ácido glutámico vecino a la cisteína, o a un ácido aspártico

---

<sup>9</sup> Guo, J.; Kleeff, J.; Li, J.; Ding, J.; Hammer, J.; Zhao, Y.; Giese, T.; Korc, M.; Büchler, M.W.; Friess, H.; *Oncogene* **2004**, 23, 71.

<sup>10</sup> (a) Fauman, E.B.; Cogswell, J.P.; Lovejoy B.; Rocque W.J.; Holmes, W.; Montana, V.G.; Piwnica-Worms, H.; Rink, M.J.; Saper, MA.; *Cell*. **1998**, 93, 617. (b) Reynolds, RA; Yem, A.W.; Wolfe, C.L.; Deibel, M.R. Jr.; Chidester, C.G.; Watenpaugh, K.D.; *J. Mol Biol.* **1999**, 293, 559.

proveniente de un loop separado.<sup>11</sup> Finalmente una molécula de agua actúa como nucleófilo en la ruptura del enlace fosforo-azufre, promovida por la base conjugada del ácido.



**Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de la enzima Cdc25B**

También existen dudas sobre el estado de protonación del fosfato en el sustrato, donde no se ha podido determinar si está en la forma mono o di-anionica<sup>12</sup> (Figura 3).

<sup>11</sup> Rudolph, J.; *Biochemistry* **2007**, 46, 3594.

<sup>12</sup> Rudolph, J.; *Biochemistry* **2002**, 41, 14613.

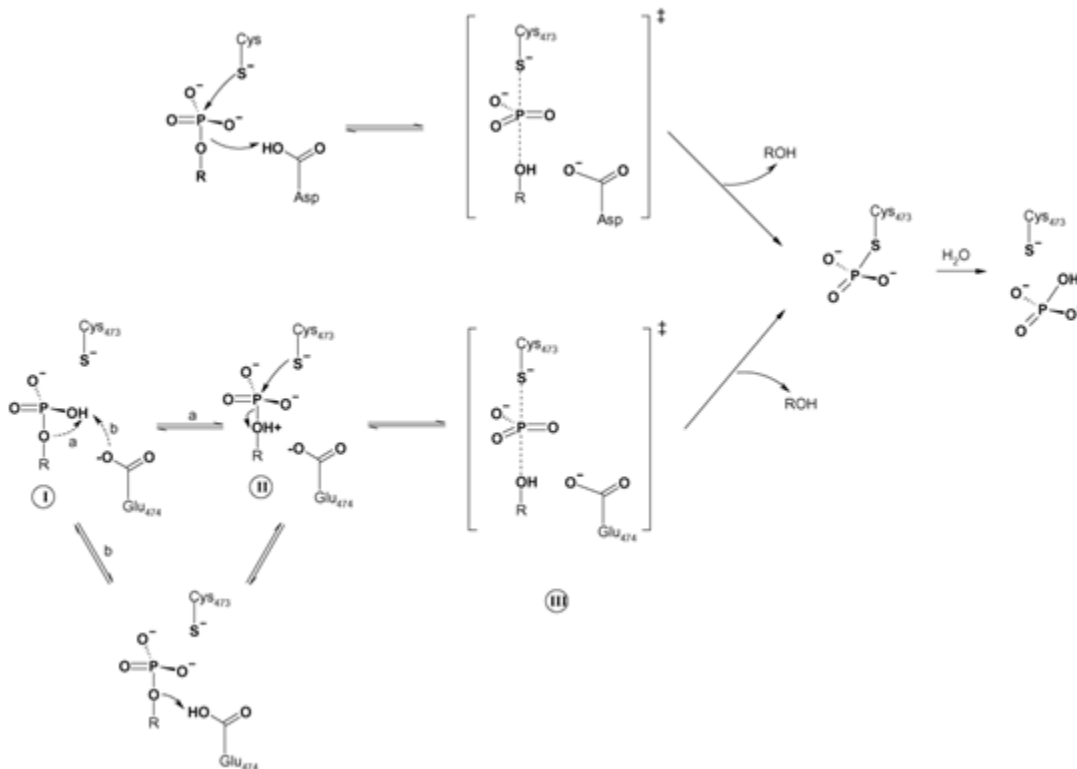


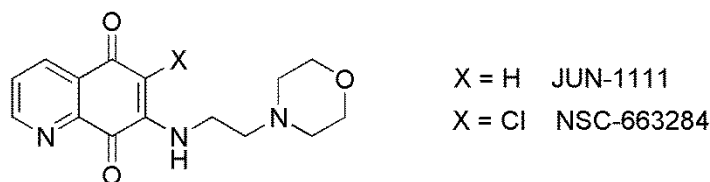
Figura 3. Posibles estados de protonación del sustrato de la enzima Cdc25B.

### 1.1.1. Quinonas como inhibidores de las Cdc25

Entre los inhibidores más potentes de la enzima Cdc25B se encuentran algunos compuestos con un núcleo *p*-quinónico. Una de las primeras quinonas estudiadas, como inhibidor de las fosfatasas Cdc25, fue la vitamina K<sub>3</sub> y sus análogos tioalquilados, con el tiempo se han desarrollado otros inhibidores basados en quinonas.<sup>13</sup> La mayoría de los inhibidores de las Cdc25 son de tipo *p*-quinonas. A través de un screening virtual computacional de la librería de compuestos del *National Cancer Institute* (NCI), se encontró una serie de compuestos quinónicos, de tipo quinolinedionas, como inhibidores de Cdc25. El compuesto

<sup>13</sup> (a) Pestell, K.E.; Ducruet, A.P.; Wipf, P.; & Lazo, J.; *Oncogene* **2000**, 19, 6607. (b) Prevost, G.P.; Brezak, M.-C.; Goubin, F.; Mondesert, O.; Galcera, M.-O.; Quaranta, M.; Alby, F.; Lavergne, O.; Ducommun, B.; *Prog. Cell Cycle. Res.* **2003**, 5, 225. (c) Ham, S.W.; Carr, B.I.; *Drug. Design. Rev.* **2004**, 1, 123. (d) Kristjansdottir, K.; Rudolph, J.; *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1043.

más potente, llamado NSC-663284, inhibe las Cdc25 in vitro de manera irreversible, con un  $IC_{50}$  de 201 nM y exhibe una cinética mixta (capaz de unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima sustrato) contra la Cdc25A, B y C.<sup>14</sup> El mapeo del potencial electrostático de las quinolindionas estudiadas y el modelamiento molecular de las Cdc25B, les permitió a los autores sugerir que la potencia de la inhibición estaba correlacionada con el incremento de la nucleofilia en posiciones clave del farmacoforo.<sup>15</sup> Posteriormente, se encontró que la NSC-663284 y su análogo sintético JUN-1111 regulan la actividad de la enzima a través de mecanismos redox. In vitro, los dos compuestos inhiben las fosfatasas Cdc25 de manera irreversible y detienen el ciclo celular en las fases  $G_1$  y  $G_2/M$ . Además, la presencia de un agente reductor, como el glutatión, disminuye la potencia de NSC663284 y JUN-1111 frente a la Cdc25B, lo cual es consistente con un mecanismo oxidativo de inactivación de la enzima.<sup>16</sup>



**Figura 4. Quinonas NSC663284 y JUN-1111, inhibidores de las enzimas Cdc25.**

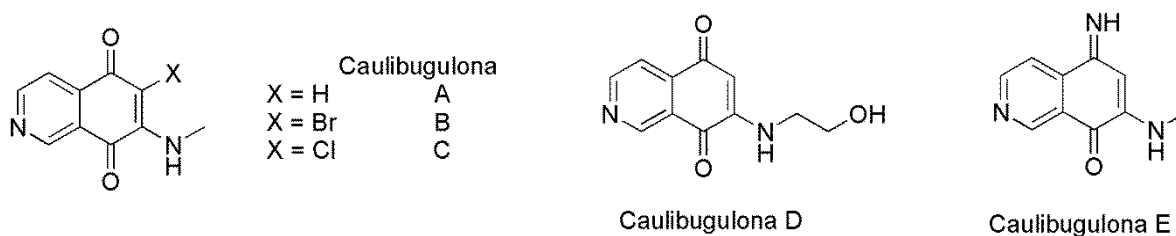
Otro ejemplo de quinonas potentes y selectivas como inhibidores de la Cdc25B, son las caulibugulonas A-E, provenientes de los extractos de briozoos marinos. Las cinco caulibugulonas inhiben la Cdc25B in vitro, con valores de  $IC_{50}$  que van entre 2,7 y 32,5

<sup>14</sup> Lazo, J.S.; Aslan, D.C.; Southwick, E.C.; Cooley, K.A.; Ducruet, A.P.; Joo, B.; Vogt, A.; Wipf, P.; *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4042.

<sup>15</sup> Lazo, J.S.; Wipf, P.; *Oncol. Res.* **2002**, 13, 347.

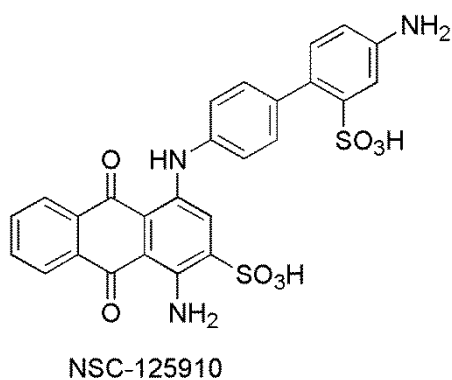
<sup>16</sup> Brisson, M.; Nguyen, T.; Wipf, P.; Joo, B.; Day, B.W.; Skoko, J.S.; Schreiber, E.M.; Foster, C.; Bansal, P.; Lazo, J.S.; *Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 1810.

$\mu\text{M}$ , con una selectividad de al menos 30 veces comparado con las fosfatasas VHR y PTP1B. Se encontró también que presentan actividad inhibitoria del crecimiento celular.<sup>17</sup>



**Figura 5. Quinonas de origen natural, Caulibugulonas A-E, con actividad inhibitoria de la enzima Cdc2B.**

Recientemente, a través de screening virtual con simulación de docking, se han identificado nuevas quinonas como inhibidores de la Cdc25B. Por ejemplo, la quinona NSC-125910 fue identificada como inhibidor, a través de un screening virtual usando la base de datos ZINC.<sup>18</sup>



**Figura 6. Estructura de quinona identificada como inhibidor de Cdc25B a través de screening virtual.**

<sup>17</sup> Wipf, P.; Joo, B.; Nguyen, T.; Lazo, J.S.; *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2173.

<sup>18</sup> Lavecchia, A.; Di Giovanni, C.; Pesapane, A.; Montuori, N.; Ragno, P.; Martucci, N.M.; Masullo, M.; De Vendittis, E.; Novellino, E.; *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4142.

## 1.2. Mitocondria como blanco farmacológico de quinonas

La mitocondria cumple varias funciones que son vitales para el funcionamiento y supervivencia de las células eucariotas.<sup>19</sup> El mal funcionamiento mitocondrial lleva a una disrupción de la actividad de las células, tejidos y órganos, siendo la causa subyacente de varios tipos de enfermedades.<sup>20</sup> La investigación orientada a emplear blancos mitocondriales con fines terapéuticos se han enfocado, en gran medida, en el cáncer, aunque también se han explorado para buscar tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, metabólicas e isquemias, entre otras.<sup>21</sup>

Específicamente, la mitocondria genera adenosin trifosfato (ATP), participa en la regulación del calcio celular, en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en el control de la muerte celular, particularmente a través de la apoptosis (muerte celular programada).<sup>64</sup> Actualmente existe un creciente interés actualmente en explotar las funciones pro-apoptóticas de la mitocondria para gatillar la muerte selectiva de células cancerosas.<sup>22</sup>

Tradicionalmente, los tratamientos para el cáncer han usado compuestos que interfieren con el proceso de división celular. Sin embargo, nuevas terapias buscan apuntar a las señales de

---

<sup>19</sup> (a) Scheffler, I.E.; *Mitochondria* **1999**. Wiley-Liss, New York. (b) Murphy, M.P.; Smith, R.A.J.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, 41, 235. (c) Nicholls, D.G.; Ferguson, S.J.; *Bioenergetics* **2002**. Academic Press, London.

<sup>20</sup> (a) Wallace, D.C.; *Lancet* **1999**, 355, 299. (c) Leonard, J.V.; Schapira, A.H.; *Lancet* **2000**, 355, 389. (d) Smeitink, J.; van den Heuvel, L.; DiMauro, S.; *Nat. Rev. Genet.* **2001**, 2, 342.

<sup>21</sup> (a) Armstrong J.S.; *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 151, 1154. (b) Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G; *Oncogene* **2006**, 25, 4812. (c) Dias N, Bailly C; *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 70, 1.

<sup>22</sup> Costantini, P.; Jacotot, E.; Decaudin, D.; Kroemer, D.; *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, 92, 1042.

crecimiento que dirigen la proliferación y sobrevivencia celular.<sup>23</sup> Las presiones del entorno fuerzan a las células tumorales a adquirir resistencia frente a la apoptosis junto con una ilimitada capacidad replicativa, con el fin de resistir las señales pro-apoptóticas automáticas que acompañan la división celular inapropiada.<sup>24</sup> Lo anterior sugiere que enfocarse en la mitocondria puede ofrecer una forma efectiva de superar la resistencia a la apoptosis de la mayoría de las células cancerosas. Un aspecto importante a considerar, es que las diferencias bioenergéticas entre células normales y cancerosas, hacen posible la acumulación de mayores cantidades de drogas en estas últimas.<sup>25</sup> Las células hiperproliferativas, como las células cancerosas, que sobreviven en condiciones de elevado estrés oxidativo son susceptibles a la muerte celular inducida por pro-oxidantes que incrementen el nivel de estrés oxidativo más allá de su capacidad de resistencia.

Desde el punto de vista estructural, las mitocondrias comprenden una matriz rodeada de dos membranas, la membrana mitocondrial interna (MMI) y la membrana mitocondrial externa (MME). La MMI es altamente impermeable a iones y moléculas pequeñas, los cuales requieren de proteínas transportadoras específicas para ingresar o salir de la matriz mitocondrial. En condiciones aeróbicas, las proteínas de la cadena de transporte electrónico (CTE), localizadas en la MMI, reducen oxígeno a agua gracias a una serie de pasos, que emplean el dinucleótido de nicotinamida y adenina (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*, NADH) y el dinucleótido de flavína adenina (*Flavin Adenine Dinucleotide*, FADH<sub>2</sub>). Estas reacciones de reducción generan el paso de protones a través de la MMI, de tal forma que

---

<sup>23</sup> Dent, S; Verma Sh, Latreille J, Rayson D, Clemons M, Mackey J, Verma S, Lemieux J, Provencher L, Chia S, Wang, B.; Pritchard, K.; *Curr Oncol* **2009**, 16, 25.

<sup>24</sup> Green, D.R.; Evan, G.I.; *Cancer Cell* **2002**, 1, 19.

<sup>25</sup> Don, A.S.; Hogg, P.J.; *Trends Mol. Med.* **2004**, 10, 372.



se acumulan en el espacio inter-membrana (EIM), creando un gradiente de pH a través de la MMI que contribuye a generar un potencial electroquímico de transmembrana. Este potencial electroquímico es usado por la enzima ATP sintasa como fuente de energía para generar ATP a partir de adenosin difosfato (ADP) y fosfato de origen inorgánico. Esta secuencia de reacciones química es conocida como fosforilación oxidativa (FO).

Durante la FO normal, se generan ROS producto de la reducción incompleta de oxígeno. Entre los ROS generados se encuentran el radical superóxido, el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo, cada uno con una reactividad particular. Una relación NADH:NAD<sup>+</sup>(forma oxidada) elevada puede aumentar la generación de ROS, como ocurre en el “estado 4”, un estado metabólico en el cual el transporte de electrones ocurre en ausencia de ATP y un bajo nivel de ADP.<sup>26</sup> Inhibidores de la cadena de transporte electrónico y de la ATP sintasa pueden también incrementar la producción de ROS. Por una parte, las ROS generan daño oxidativo en las macromoléculas celulares, pero por otro lado actúan también como mensajeros secundarios en importantes vías de señalización.<sup>27</sup> Por lo anterior, los ROS juegan tanto un papel destructivo como necesario dentro de las células.

Los inhibidores de la cadena de transporte electrónico pueden ser útiles para comprender procesos esenciales de la bioenergética mitocondrial y además, ser interesantes como nuevos medicamentos, por ejemplo contra el cáncer. Entre los inhibidores del complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa) encontramos, la rotenona,<sup>28</sup> proveniente de

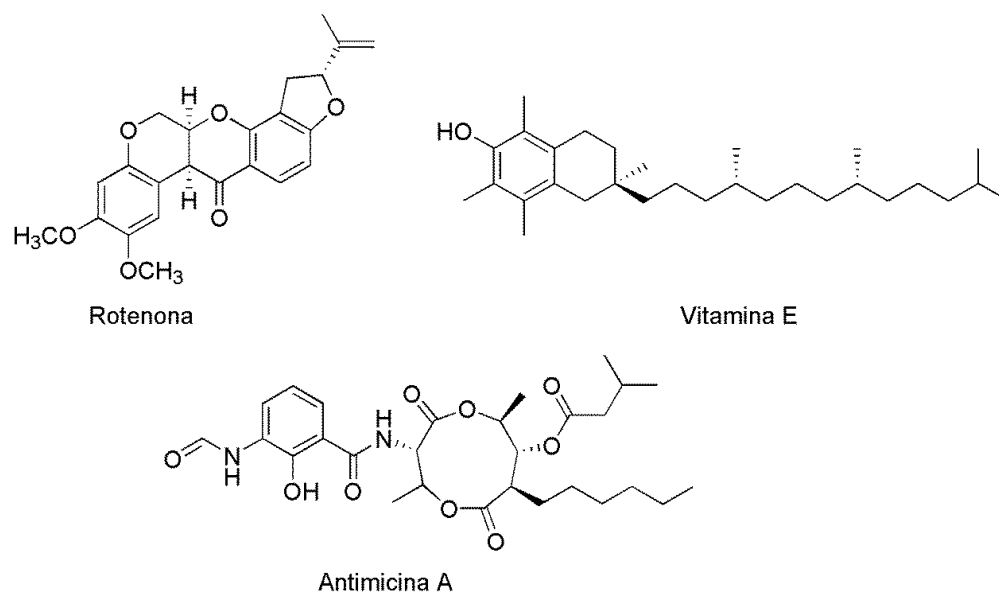
---

<sup>26</sup> Adam-Vizi V, Chinopoulos C.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 639.

<sup>27</sup> Armstrong, J.S.; *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 151, 1154.

<sup>28</sup>(a) Robertson, D.R.; Smith-Vaniz, W.F.; *Bio. Science* **2008**, 58, 165. (b) Li, N.; Ragheb, K.; Lawler, G.; Sturgis, J.; Rajwa, B.; Melendez J.A.; Robinson, J.P.; *J Biol Chem.* **2003**, 278, 8516.

leguminosas tropicales, y los productos naturales de la planta *Uvaria acuminata*, acetogeninas.<sup>29</sup> Los derivados de vitamina E tales como,  $\alpha$ -tocoferil succinatos, han mostrado ser inhibidores del complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa).<sup>30</sup> El complejo III (citocromo *c* oxidoreductasa) es inhibido por antimicina A,<sup>31</sup> un metabolito de la bacteria *streptomyces*, y el producto natural proveniente de la bacteria *Myxococcus fulvus*, mixotiazol.<sup>32</sup> El complejo IV (citocromo *c* oxidasa) es blanco para el cianuro. Los complejos I y III son las principales fuentes de ROS derivados de la mitocondria *in vitro*, aunque la generación de superóxido por parte del complejo III, es considerada fisiológicamente más relevante.<sup>33</sup>



**Figura 7. Inhibidores mitocondriales: Rotenona complejo I, Vitamina E complejo II y Antimicina A complejo III.**

<sup>29</sup>(a) Alali, F.Q.; Liu, X.-X.; Mc Laughlin, J.L.; *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 504. (b) Makabe, H.; Konno, H.; Miyoshi, H.; *Curr Drug Discov Technol.* **2008**, 5, 213. (c) Tormo J.R.; Royo I.; Gallardo T.; Zafra-Polo M.C.; Hernández, P.; Cortes, D.; Pelaez F.; *Oncol. Res.* **2003**, 14, 147.

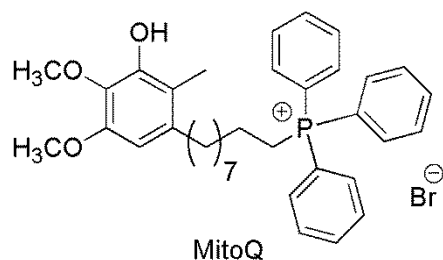
<sup>30</sup>(a) Neuzil, J.; Tomasetti, M.; Zhao, Y.; Dong, L.F.; Birringer, M.; Wang, X.F.; Low, P.; Wu, K.; Salvatore, B.A.; Ralph, S.J.; Vitamin, E.; *Mol. Pharmacol.* **2007**, 71, 1185. (b) Neuzil, J.; Dyason, J.C.; Freeman, R.; Dong, L.F.; Prochazka, L.; Wang, X.F.; Scheffler, I.; Ralph, S.J.; *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, 39, 65.

<sup>31</sup> Dairaku, N.; Kato, K.; Honda, K.; Koike, K.; Iijima, K.; Imatani, A.; Sekine, H.; Ohara, S.; Matsui, H.; Shimosegawa, T.; *J. Lab. Clin. Med* **2004**, 143, 143.

<sup>32</sup> Thierbach, G.; Reichenbach, H.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1981**, 638, 282.

<sup>33</sup> Adam-Vizi, V.; Chinopoulos, C.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 639.

La coenzima Q<sub>10</sub> y otras quinonas relacionadas han sido usadas en terapias que disminuyen el daño oxidativo mitocondrial.<sup>34</sup> El derivado de ubiquinona conocido como mitoquinona (mitoQ) ha mostrado ser efectivo como protector frente a la peroxidación lipídica en mitocondrias de ratas vivas y prevenir la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno en células mamarias.<sup>35</sup> En células bovinas de endotelio aórtico, este compuesto ha reducido el daño oxidativo inducido por glucosa y la enzima glucosa oxidasa.<sup>36</sup> Aunque se había sugerido previamente que mitoQ disminuía la producción de ROS, recientemente se demostró que podía incrementar la producción de oxígeno radical O<sub>2</sub><sup>\*</sup> en mitocondrias alimentadas por los sustratos del complejo I, glutamato y malato. Otras evidencias también sugieren que mitoQ disminuye la biodisponibilidad de óxido nítrico mitocondrial a través de la generación de ROS.<sup>37</sup>



**Figura 8. Mitoquinona un análogo a ubiquinona con capacidad protectora frente a lipoperoxidación lipídica en mitocondrias.**

<sup>34</sup> (a) Shults, C.W.; Oakes, D.; Kiebertz, K.; Beal, M.F.; Haas, R.; Plumb, S.; Juncos, J.L.; Nutt, J.; Shoulson, I.; Carter, J.; Kompoliti, K.; Perlmutter, J.S.; Reich, S.; Stern, M.; Watts, R.L.; Kurlan, R.; Molho, E.; Harrison, M.; Lew, M.; *Arch. Neurol.* **2002**, 59, 1541. (b) Shults, C.W.; Flint Beal, M.; Song, D.; Fontaine, D.; *Exp. Neurol.* **2004**, 188, 491.

<sup>35</sup> Kelso, G.F.; Porteous, C.M.; Hughes, G.; Ledgerwood, E.C.; Gane, A.M.; Smith, R.A.; Murphy, M.P.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, 959, 263.

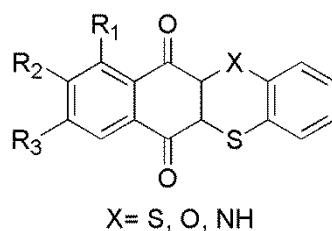
<sup>36</sup> Dhanasekaran, A.; Kotamraju, S.; Kalivendi, S.V.; Matsunaga, T.; Shang, T.; Keszler, A.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B.; *J Biol Chem* **2004**, 279, 37575.

<sup>37</sup> James, A.M.; Cocheme, H.M.; Smith, R.A.; Murphy, M.P.; *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 21295.

### 1.3. Aspectos generales de las quinonas

El núcleo quinónico es una estructura relevante dentro de diversas áreas de la química. Esta agrupación molecular está presente en un gran número de compuestos, de origen natural y sintético, con aplicaciones en química medicinal y de materiales.

Por ejemplo, quinonas conjugadas con grupos electro-dadores presentan gran interés debido a sus posibles aplicaciones tecnológicas. Bando y colaboradores<sup>38</sup> han reportado quinonas sulfo-oxo conjugadas con propiedades semiconductoras (Figura 9). En la misma línea, Illescas y colaboradores,<sup>39</sup> reportan quinonas sulfo-aza conjugadas que también presentan interés como materiales tecnológicos.



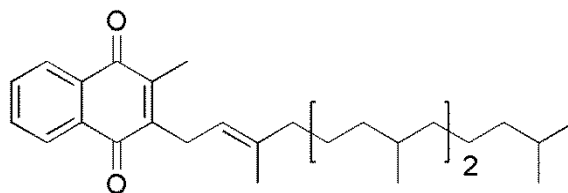
**Figura 9. Quinonas sulfo-oxo y sulfo-aza sustituidas.**

Otro aspecto importante es el papel que juegan en los sistemas vivos. Por ejemplo, la serie de vitaminas K (Figura 10), un conjunto de moléculas que poseen un núcleo naftoquinónico sustituido con una cadena alquílica de distinto largo, y que son importantes en la coagulación sanguínea.<sup>40</sup>

<sup>38</sup> Bando, P.; Martin, N.; Segura, J.L.; Seoane, C.; Orti, E.; Viruela, P.M.; Viruela, R.; Albert, A.; Cano F.H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4618.

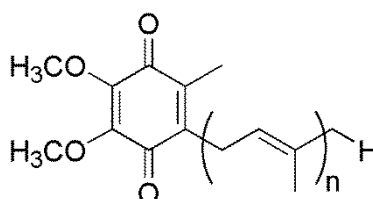
<sup>39</sup> Illescas, B.; Martin, N.; Segura, J.L.; Seoane, C.; Orti, E.; Viruela, P.M.; Viruela, R. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5643.

<sup>40</sup> Fieser, LF, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 3467.



**Figura 10. Vitamina K1**

Otro ejemplo de quinonas importantes en procesos biológicos son las ubiquinonas, también llamadas Coenzimas Q (CoQ), la cuales participan, a través de reacciones redox, en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Figura 11).<sup>41</sup>



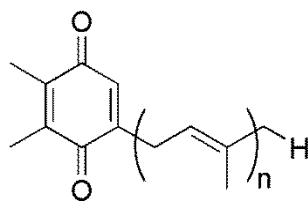
**Figura 11. Estructura de las ubiquinonas (n = 6-10)**

En los mamíferos, la forma más común de CoQ corresponde a la molécula con diez unidades isoprenicas ( $-\text{[CH}_2\text{-CH-C(CH}_3\text{)]}_n\text{-}$ ) en la cadena alquílica.

En las plantas la generación de energía ocurre a través de la fotosíntesis en los cloroplastos. Uno de las moléculas vitales en este proceso es un grupo de quinonas conocida como plastoquinonas (Figura 12).<sup>42</sup>

<sup>41</sup> Wolf, D.E.; Hoffman, C.H.; Trenner, N.R.; Arison, B.H; Shunk, C.H.; Linn, B.O.; McPherson, J.F.; Folkers, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 4752.

<sup>42</sup> Crane FL, *Photosynth Res.* **2010**, 103, 195.



**Figura 12. Estructura de las plastoquinonas (n = 6 -10)**

Por otro lado, un gran número de compuestos con un núcleo quinónico en su estructura, presentan actividad farmacológica. Se han encontrado quinonas activas como agentes antitumorales,<sup>43</sup> antifúngicos,<sup>44</sup> antiparasitarios,<sup>45</sup> cardioprotectores,<sup>46</sup> entre otros.

Las quinonas forman la segunda mayor clase de agentes antiproliferativo de células de cancer para uso clínico en Estados Unidos, así como también un gran número de ellas se encuentran en fase de estudios clínicos y preclínicos.<sup>47</sup> Recientemente, se reportaron<sup>48</sup> dos nuevas quinonas citotóxicas, aisladas desde cultivos de antinomicetes, relacionados con el género *Streptomyces*, presentes en sedimentos marinos. La marmicina A presenta un efecto citotóxico significativo, a concentraciones nanomolares, frente a varias líneas celulares de cáncer. La marmicina B, un análogo clorado de la A, es menos potente.

<sup>43</sup> Kogan, N.M.; Rabinowitz, R.; Levi, P.; Gibson, D.; Sandor, P.; Schlesinger, M.; Mechoulam, R.; *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3800.

<sup>44</sup> Meazza, G.; Dayan, F.E.; Wedge, E.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3824.

<sup>45</sup> Bauer, H.; Fritz-Wolf, K.; Winzer, A.; Kühner, S.; Little, S.; Yardley, V.; Vezin, H.; Palfey, B.; Schirmer, R.H.; Davioud-Charvet, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10784.

<sup>46</sup> Zhu, BQ; Zhou, HZ; Teerlink, JR; Karliner, J.S.; *Cardiovasc Drugs Ther.* **2004**, 18, 421.

<sup>47</sup> Boyle, R. G.; and Travers, S.; *Anticancer Agents Med. Chem.* **2006**, 6, 281.

<sup>48</sup> Martin, G. D. A.; Tan, L. T.; Jensen, P. R.; Dimayuga, R. E.; Fairchild, C. R.; Raventos-Suarez, C.; Fenical, W.; *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 1406.

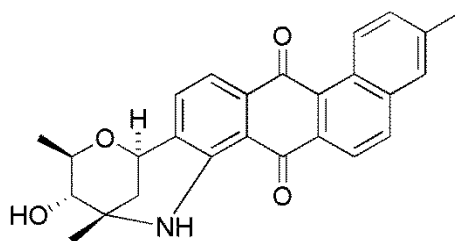


Figura 13. Marmicina A con actividad anti-cáncer.

Por otro lado, la gran mayoría de los agentes alquilantes empleados en el proceso de alquilación biorreductiva se comportan como trampas electrofílicas para nucleófilos moleculares. Tales nucleófilos frecuentemente son aminoácidos tales como la cisteína, lisina, tirosina, y treonina. Un blanco de esta interacción son las enzimas relacionadas con la replicación del ADN, como la topoisomerasa II. Alrededor de la mitad de todos los tratamientos anti-cáncer contienen quinonas que actúan sobre esta enzima. Se ha encontrado que actúan uniéndose covalentemente a los residuos aminoácidos Cys392 y Cys405 de la enzima, aumentando los niveles de ruptura enzima-ADN e inhibiendo la replicación del ADN.<sup>49</sup> Además, las bases nitrogenadas del ADN y ARN representan posibles blancos para agentes alquilantes quinónicos (Figura 14).<sup>50</sup>

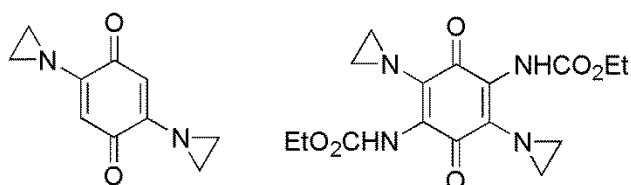


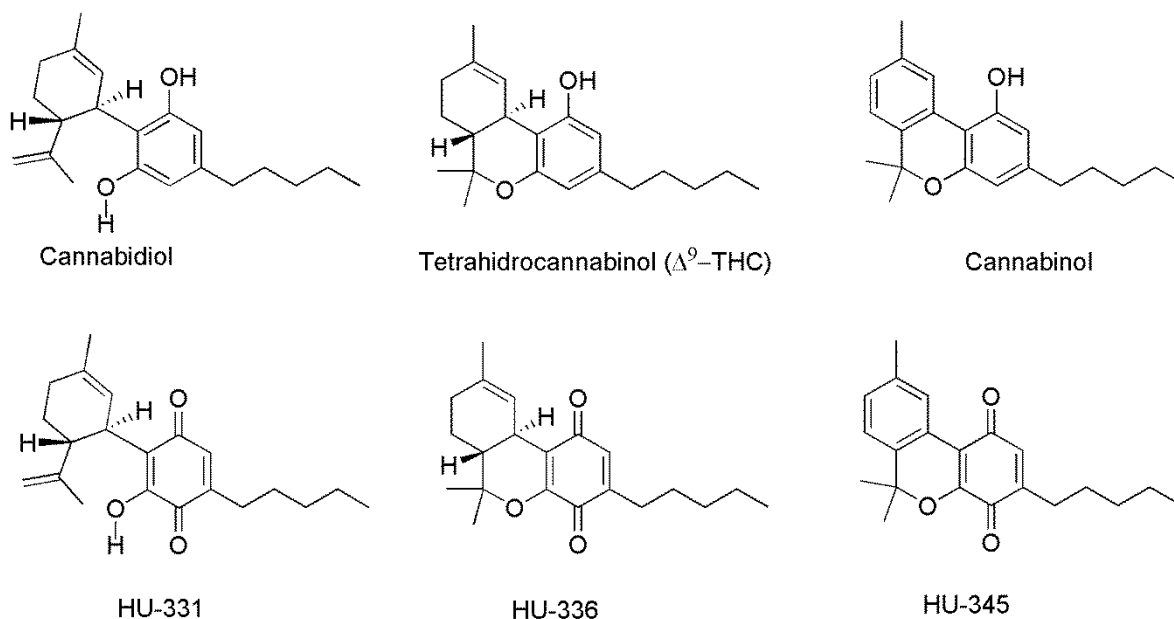
Figura 14. Diaziridilquinonas que actúan como agentes alquilantes de ADN.

<sup>49</sup> Bender, R. P.; Ham, A. J. L.; Osheroff, N.; *Biochemistry* **2007**, 46, 2856.

<sup>50</sup> (a) de Abreu, F. C.; Ferraz, P. A. de L.; Goulart, M. O. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 19. (b) Kovacic, P.; Osuna Jr.; J. A.; *Curr. Pharm. Des.* **2000**, 6, 277. (c) Rajski, S. R.; Williams, R. M.; *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2723.

En estos procesos se emplean normalmente como prodrogas y la activación ocurre a través de procesos redox. Los agentes de entrecruzamiento de cadenas del ADN comprenden una importante clase de agentes anti-cáncer.<sup>13</sup>

Por ejemplo, se ha reportado la oxidación sintética de tres moléculas provenientes de la *Cannabis sativa*, el cannabidiol, el  $\Delta^8$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) y el cannabinol a sus correspondientes quinonas HU-331, HU-336, HU-345.<sup>51</sup> Estas tres quinonas exhibieron actividad antiproliferativa *in vivo* frente a distintas líneas celulares tumorales, y la quinona HU-331, en particular, redujo significativamente el crecimiento de células HT-29 de cáncer colorrectal en ratones.<sup>14</sup>



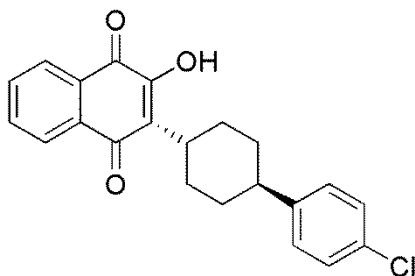
**Figura 15. Compuestos derivados de la *Cannabis Sativa* con actividad antitumoral.**

Los compuestos que sustituyen metabolitos en las vías metabólicas, son conocidos como antimetabolitos, y el proceso es llamado “sabotaje molecular”. El “sabotaje molecular” en

<sup>51</sup> Kogan, N. M.; Rabinowitz, R.; Levi, P.; Gibson, D.; Sandor, P.; Schlesinger, M.; Mechoulam, R.; *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3800.



la cadena de transporte electrónico de la mitocondria, es llevado a cabo mayoritariamente empleando quinonas, que interrumpen la generación de energía en la célula. Tal es el caso de la atovaquona, un análogo de la coenzima Q que presenta una acción antiparasitaria de amplio espectro. Actúa inhibiendo el transporte de electrones y despolarizando la membrana mitocondrial de los protozoos *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, transmisores de la malaria, generándole daño y muerte celular.<sup>13a,52</sup>



**Figura 16. Atovaquona, una droga antiparasitaria.**

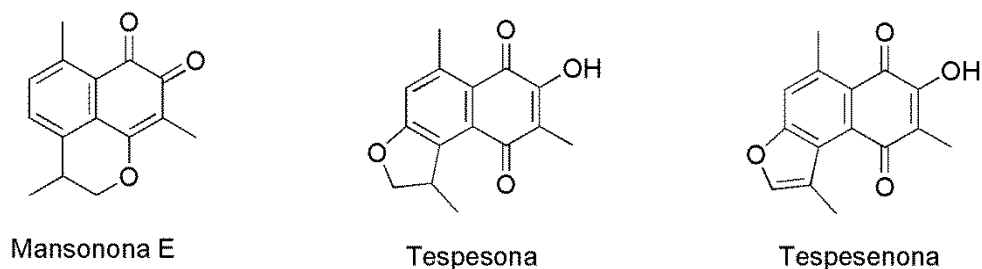
Las plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*) producen varias moléculas de tipo sesquiterpenos, cuando son atacadas por patógenos. Estos compuestos son tóxicos para estos patógenos, y por lo tanto ayudan a la planta a protegerse. Se ha reportado<sup>53</sup> que la *Thespesia populnea*, conocida también como Milo o árbol de Portia, arbusto originario de Hawaii, es una gran fuente de quinonas sesquiterpenoides. Se han aislado, de esta planta, compuestos quinonicos como la mansonona E, la tespesona<sup>54</sup> y la tespesenona<sup>55</sup>, similares a los producidos por el algodón, y que son objeto de un amplio estudio de su actividad biológica.

<sup>52</sup> Syafruddin, D.; Siregar, J. E.; Marzuki, S.; *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, 104, 185.

<sup>53</sup> Puckhaber, L. S.; Stipanovic, R. D.; *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1571.

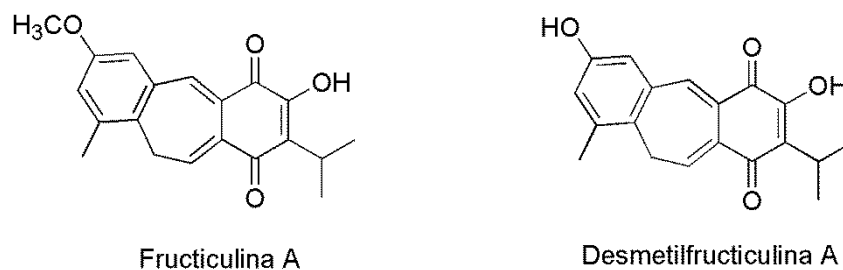
<sup>54</sup> Neelakantan, S.; Rajagopalan, V.; Raman, P. V. *Ind. J. Chem. Sec. B* **1983**, 22, 95

<sup>55</sup> Puckhaber, L. S.; Stipanovic, R. D.; *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1571.



**Figura 17. Sesquiterpenquinonas de origen natural.**

Otro ejemplo de compuestos de origen natural con actividad biológica, son la fructulina A y la desmetilfructulina A, quinonas diterpénicas aisladas desde la *Salvia corrugata*.<sup>56</sup> Estas quinonas fueron evaluadas frente a 46 patógenos bacterianos, resistentes a muchos antibióticos primarios. La desmetilfructulina A presentó una elevada actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* y bacteriostática contra *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*. La fructulina A exhibió actividad frente a todas las cepas del estudio.

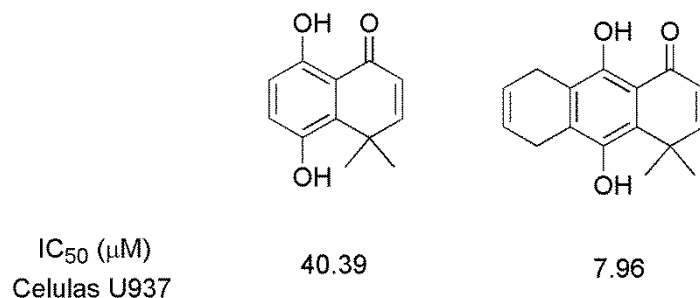


**Figura 18. Quinonas diterpénicas de origen natural.**

También algunas quinonas, y sus correspondientes hidroquinonas, sintéticas han mostrado interesantes propiedades biológicas. Nuestro grupo de investigación ha reportado la actividad de una serie de hidroquinonas tricíclicas, que poseen un grupo carbonilo en posición *orto* respecto a uno de los hidroxilos fenólicos, como inhibidores de la respiración en la línea celular TA3 de carcinoma mamario de ratón y su variante multiresistente TA3-

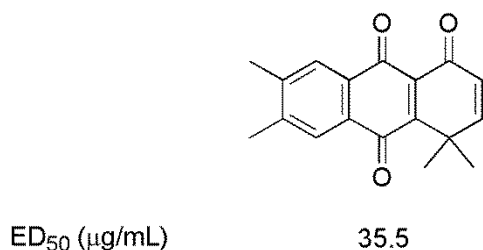
<sup>56</sup> Bisio, A.; Romussi, G.; Russo, E.; Cafaggi, S.; Schito, A. M.; Repetto, B.; De Tommasi, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 10468.

MTX-R.<sup>57</sup> Se encontró que la 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antracena (Figura 19) inhibe la respiración en las células tumorales y su variante resistente con un valor de IC<sub>50</sub> menor que 0,1 μm. Este compuesto también inhibe el crecimiento de células tumorales de la línea celular U937 (leucemia humana monocigótica) en concentraciones micromolares.



**Figura 19.** Algunas hidroquinonas sintetizadas anteriormente en nuestro laboratorio, que presentan actividad antitumoral.

De la misma forma, nuestro grupo en colaboración con otros, ha reportado quinonas e hidroquinonas tricíclicas con actividad anti-fúngica frente al hongo *Botrytis cinerea*, siendo el compuesto más activo, la quinonas mostrada en la Figura 20.

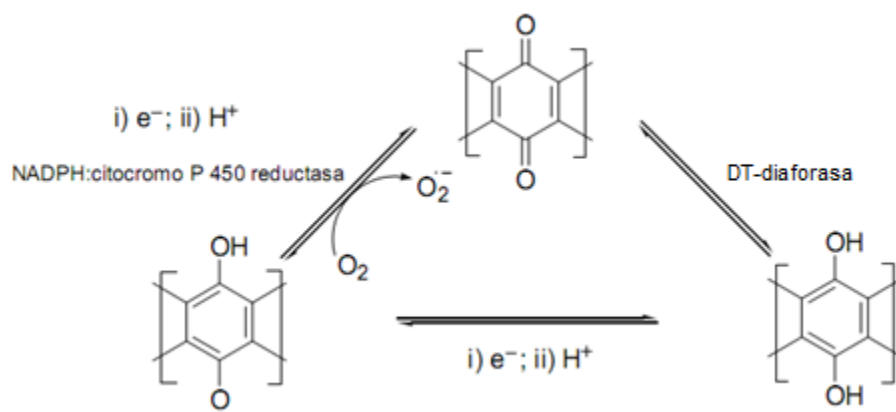


**Figura 20.** Quinona sintetizada anteriormente en nuestro laboratorio con efecto en el crecimiento micelial de la cepa G29 de la *B. Cinerea*.

Las quinonas pueden actuar principalmente por dos vías en los sistemas biológicos, como agentes oxidantes y como electrófilos.

<sup>57</sup> Araya-Maturana, R.; Cardona, W.; Cassels, B. K.; Delgado-Castro, T.; Ferreira, J.; Miranda, D.; Pavani, M.; Pessoa-Mahana, H.; Soto-Delgado, J.; Weiss-López, B.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 4664.

En presencia de reductores, son capaces de aceptar un electrón para formar el radical semiquinona y posteriormente un segundo electrón para generar una hidroquinona o directamente dos electrones para dar la hidroquinona. Estas reacciones están catalizadas por enzimas reductasas (citocromo P450 para el caso mono-electrónico y DT-diaforasa para el caso bi-electrónico). En condiciones aeróbicas, el radical semiquinona se oxida a la quinona de partida. Este proceso de reducción y oxidación para formar la quinona de partida se conoce como “*ciclaje redox*”(Figura 21). Este proceso genera radicales libres, tales como el anión radical superóxido  $O_2^{\cdot -}$ , el cual dismuta en solución acuosa a  $H_2O_2$  y  $O_2$ . A su vez el peróxido de hidrógeno reacciona con el hierro generando radicales hidroxilos ( $OH^{\cdot}$ ). Este tipo de radicales son conocidos como especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS)<sup>58</sup>.



**Figura 21. Ciclaje redox de quinonas.**

La acción de las ROS en el medio celular genera daños en el ADN, proteínas, etc.<sup>59</sup> por lo que en principio la acción de las quinonas puede ser toxica. Sin embargo se ha encontrado que algunas quinonas pueden inducir selectivamente apoptosis en células tumorales,

<sup>58</sup> Bolton, J.L.; Trush, M.A.; Penning, T.M.; Dryhurst, G.; Monks, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 135.

<sup>59</sup>Hoye, A.T.; Davoren, J.E.; Wipf, P.; Fink, M.P.; Kagan, V.E.; *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 87.

precisamente por el aumento de las ROS. Se ha sugerido que esta aparente paradoja podría deberse a que las células tumorales producen una mayor cantidad de ROS que las células normales<sup>60</sup> y tienen una menor tolerancia al estrés oxidativo<sup>61</sup>.

Las quinonas además de su capacidad como agentes oxidantes, también pueden actuar como electrófilos en reacciones de adición o sustitución, uniéndose covalentemente con nucleófilos presentes en moléculas biológicas.<sup>62</sup> Que la reacción con el nucleófilo sea una adición o sustitución, depende del sustituyente en el doble enlace quinónico (Figura 22). En la reacción de adición oxidativa (**A**) el nucleófilo se une a la quinona, dando un intermediario aniónico estabilizado por la aromatización del anillo, que puede captar protones para formar la hidroquinona correspondiente. Posteriormente esta hidroquinona puede oxidarse para generar la quinona con el nucleófilo unido. Por otro lado, es posible que ocurra la reacción de sustitución nucleofílica (**B**), cuando la quinona presenta un buen grupo saliente en el doble enlace. En este caso, el nucleófilo se adiciona al carbono enlazado al sustituyente, el cual luego actúa como grupo saliente, generándose nuevamente el doble enlace.

---

<sup>60</sup>Szatrowski, T.P.; Nathan, C.F. *Cancer Res.* **1991**, 51, 794.

<sup>61</sup>Schumacker, P.T. *Cancer Cell* **2006**, 10, 175.

<sup>62</sup>Li, W.W.; Heinze, J.; Haehnel, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6140.

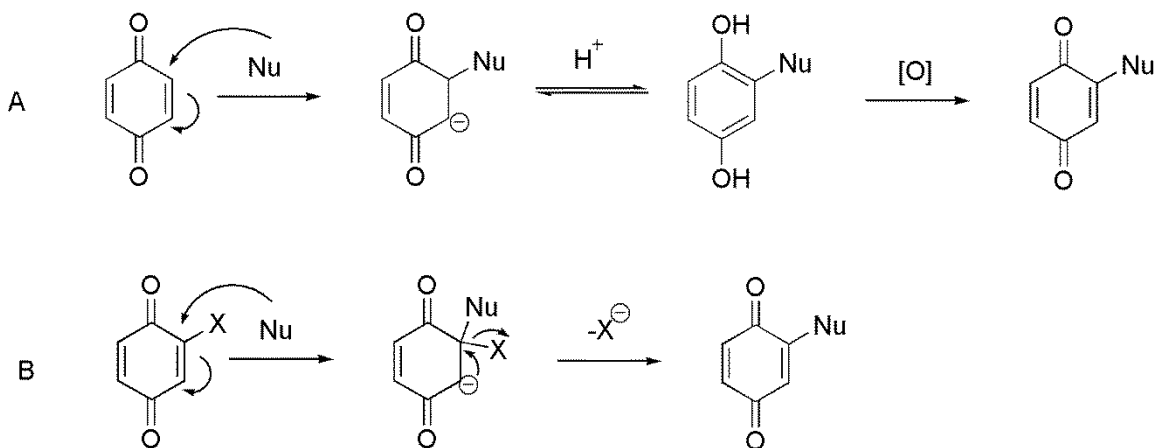


Figura 22. (A) adición oxidativa, (B) sustitución nucleofílica en quinonas.

La capacidad de las quinonas de producir “*ciclaje redox*”, está dada por su potencial de reducción<sup>63</sup>. Estudios realizados en sistemas biológicos sugieren que quinonas con potenciales de reducción entre -270 a -160 mV, aproximadamente, generan “*ciclaje redox*”.<sup>64</sup> De esta forma, las quinonas pueden actuar solo como electrófilos, solo como generadores de “*ciclaje redox*” o por ambos mecanismos a la vez, dependiendo de los sustituyentes que posea y de cómo estos modulan sus propiedades.

### 1.3.1. Aminoquinonas

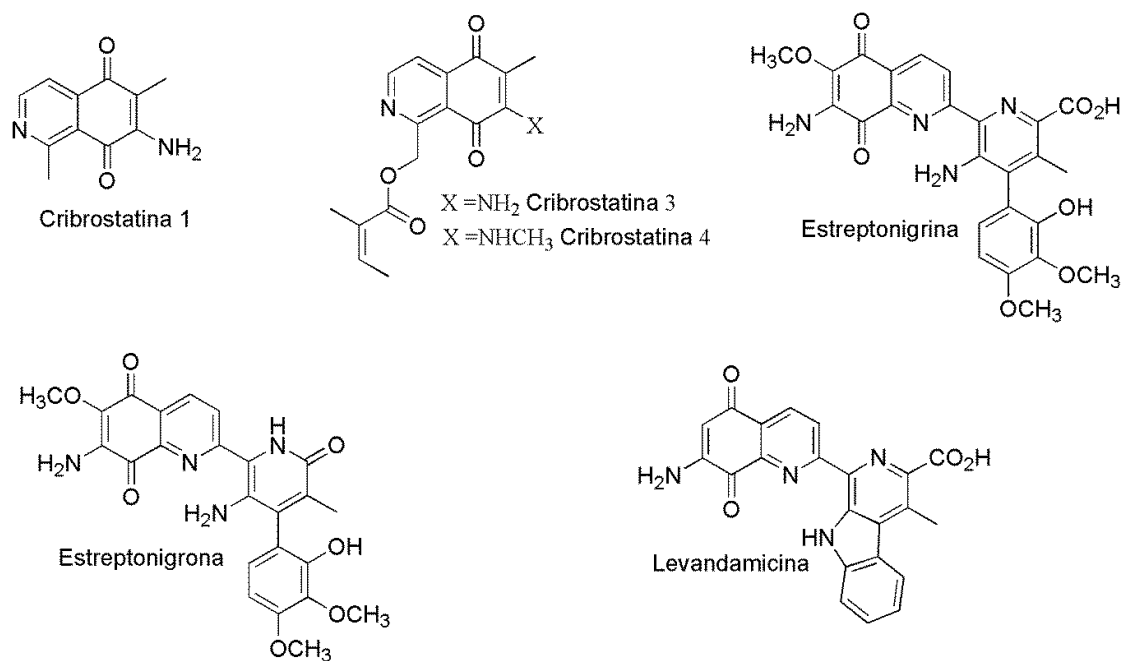
Como mencionamos previamente, la actividad biológica de las quinonas está directamente relacionada con la capacidad de transferencia electrónica que poseen. Que sufran una reducción mono- o bi-electrónica, depende directamente de su estructura química. La capacidad oxidante puede ser modulada por la inclusión de sustituyentes con distintos tipos de efectos electrónicos. Se ha sugerido que la inclusión de heteroátomos que conecten

<sup>63</sup>Song, Y.; Buettner, G.R. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 49, 919.

<sup>64</sup>Rodríguez, C. E.; Shinyashiki, M.; Froines, J.; Yu, R. C.; Fukuto, J. M.; Cho, A. K. *Toxicology* **2004**, 201, 185.

fenilos sustituidos al núcleo quinonico, constituye una interesante aproximación para lograr una variación gradual de sus propiedades electrónicas.<sup>65</sup>

En este contexto, un fragmento quinonico de gran importancia, debido a que se encuentra presente en una gran variedad de compuestos de interés farmacológico, es la estructura aminoquinonica. Este núcleo se encuentra presente en compuestos de origen natural (Figura 23), tales como las cribostatinas 1, 3 y 4 aisladas de la esponja marina *Cribochalina*, las cuales presentan actividad antibacteriana, antifúngica y antitumoral.<sup>66</sup> También poseen un núcleo aminoquinonico la estreptonigrina 5, estreptonigrona 6 y levandamicina 7, aisladas de diferentes especies de actinobacterias (género *streptomyces*), las cuales presentan actividad antitumoral.<sup>67</sup>



**Figura 23. Aminoquinonas de origen natural.**

<sup>65</sup> (a)Stradins, J.; Glezer, V.; Turovska, B.; Markava, E.; Freimanis J. *Electrochim. Acta* **1991**, 36, 1219. (b) Glezer, V.; Turovska, B.; Stradins, J.; Freimanis, J. *Electrochim. Acta* **1990**, 35, 1933.

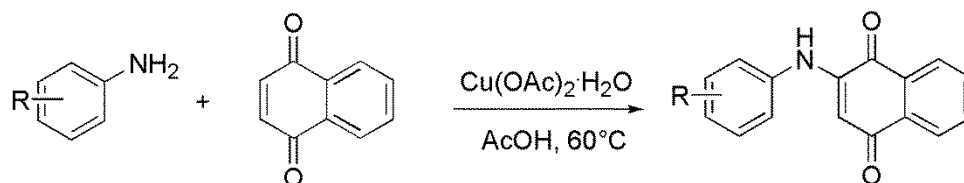
<sup>66</sup> Pettit, G. R.; Knight, J. C.; Collins, J. C.; Herald, D. L.; Pettit, R. K.; Boyd, M. R.; Young, V. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 793.

<sup>67</sup> Chan, B.K.; Ciufolini, M.A. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8489.

Las metodologías para obtener aminoquinonas se basan en reacciones de adición o sustitución nucleofílica de la amina sobre la quinona. Cuando la quinona presenta sustituyentes (que sean buenos grupos salientes, comúnmente halógenos) en el doble enlace del anillo quinónico, la reacción es preferentemente una sustitución nucleofílica. Mientras que sin la presencia de sustituyentes, la reacción que ocurre es una adición oxidativa.

Cuando la quinona es asimétrica, existe la posibilidad de obtener regioisómeros, el control de este aspecto toma entonces un papel importante. La presencia de sustituyentes, vecinos a la posición de los carbonilos quinónicos, puede dirigir la regioselectividad dependiendo de la capacidad como grupo saliente que presenten los sustituyentes. Sin embargo, este aspecto está limitado por la necesidad de funcionalizar la quinona previamente, con buenos grupos salientes (como halógenos o triflatos), lo cual puede resultar problemático.

Por otro lado, la adición oxidativa no requiere de la funcionalización de la quinona. Se han reportado reacciones catalizadas por ácidos de Lewis, los cuales facilitarían la etapa de adición tipo Michael a la enona en la adición oxidativa. Así por ejemplo, se describe la reacción de anilinas con naftoquinona utilizando acetato de cobre (II) como catalizador,<sup>68</sup> obteniéndose buenos rendimientos en corto tiempo (Figura 24).



**Figura 24. Adición oxidativa catalizada por  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$**

<sup>68</sup> Lisboa, C.S.; Santos, V.G.; Vaz, B.G.; de Lucas, N.C.; Eberlin, M.N.; Garden, S.J. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5264.



Uno de los primeros estudios de adiciones oxidativas catalizadas por ácidos de Lewis, describe la reacción de 5,8-quinolinquinona con anilinas mediada por Cloruro de Cerio (III),<sup>69</sup> donde se observó una elevada regioselectividad al usar el catalizador (Figura 25).

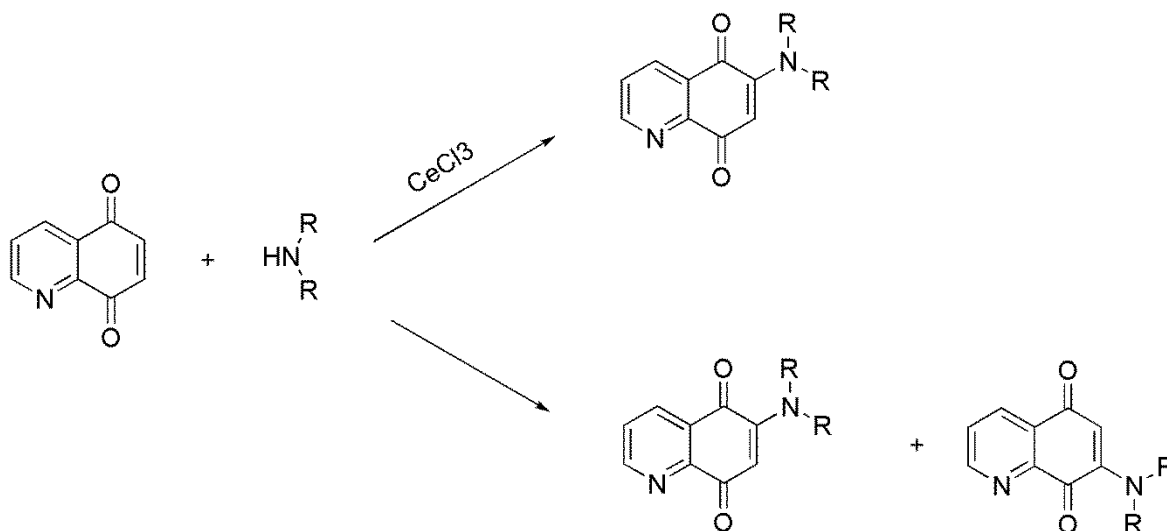


Figura 25. Regioselectividad en adición oxidativa catalizada por CeCl<sub>3</sub>.

### 1.3.2. Propiedades de las quinonas

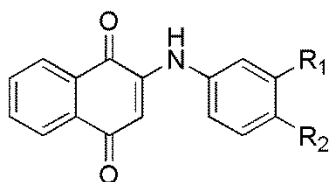
Quizás la característica más notable de las quinonas sea su capacidad como agentes oxidante, la cual como mencionamos anteriormente, es ampliamente utilizada en los sistemas biológicos. La habilidad de las quinonas de aceptar electrones depende directamente de su estructura química.<sup>70</sup> La capacidad electro-aceptora de estos compuestos

<sup>69</sup>Pratt, Y. T. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3905.

<sup>70</sup>Zuman, P. *Substituents Effects in Organic Polarography* **1967**; Plenum Press: New York, New York.

puede ser modificada por la adición de sustituyentes directamente al anillo quinonico,<sup>71</sup> siendo particularmente interesante el caso donde esos sustituyentes son grupos fenilos.<sup>72,73</sup> El efecto dador o atractor de los sustituyentes unidos al anillo quinonico facilita o dificulta la transferencia electrónica hacia la quinona. La investigación en esta área se centra en el control gradual de las propiedades electrónicas, moduladas por el efecto de los sustituyentes. Para lograr este control gradual, se han sugerido estructuras de tipo quinona-X-aromático, siendo el conector X un heteroátomo con pares electrónicos libres.<sup>74,75</sup> La presencia del heteroátomo permite la modulación del efecto de los sustituyentes en el anillo aromático, afectando la geometría de las moléculas neutras y excitadas.

Como conectores capaces de unirse a quinonas, se han usado comúnmente anilinas. Aguilar-Martínez y colaboradores<sup>76</sup> estudiaron el efecto de los sustituyentes en el anillo aromático sobre las propiedades espectroscópicas y electroquímicas de anilinas derivadas de la *p*-naftoquinona (Figura 26).



**Figura 26. Anilinas derivadas de *p*-naftoquinona.**

<sup>71</sup>Huntington, J. L.; Davis, D. G. *J. Electrochem.Soc.* **1971**, 118, 57.

<sup>72</sup>Li, C. Y.; Caspar, M. L.; Dixon, D. W. *Electrochim. Acta* **1980**, 25, 1135.

<sup>73</sup>Qureshi, G. A.; Ireland, N. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1981**, 90, 223-226.

<sup>74</sup>Stradins, J.; Glezer, V.; Turovska, B.; Markava, E.; Freimanis, J. *Electrochim. Acta* **1991**, 36, 1219.

<sup>75</sup>Glezer, V.; Turovska, B.; Stradins, J.; Freimanis J. *Electrochim.Acta* **1990**, 35, 1933.

<sup>76</sup>M. Aguilar-Martínez, G. Cuevas, M. Jiménez-Estrada, I. González, B. Lotina-Hennsen, N. Macías-Ruvalcaba, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 3684.

A través de los espectros electrónicos de las moléculas, se encontró que se producía una transferencia de carga intramolecular desde el nitrógeno hacia la fracción quinónica, el cual se veía influido por el sustituyente presente en el anillo aromático. De la misma forma, los potenciales de reducción de las moléculas mostraron la influencia de los sustituyentes. Tanto los parámetros espectroscópicos ( $\lambda_{\text{max}}$ ) como electroquímicos ( $E_{1/2}$ ) mostraron una correlación lineal con el parámetro de Hammett  $\sigma_x$ .<sup>77</sup> En un trabajo posterior, llevado a cabo por el mismo grupo de investigación<sup>78</sup>, se estudiaron teóricamente las propiedades de estas moléculas, a través de cálculos de DFT. Los resultados mostraron que todas las moléculas son no planas en su forma neutra, exhibiendo dos subsistemas aromáticos diferenciados. Mientras que todas las especies reducidas dianiónicas presentan planaridad, y están completamente conjugadas. Los resultados mostraron, entre otras cosas, que el cambio en la planaridad de las moléculas era dirigido por efectos electrónicos y no por efectos estéricos.

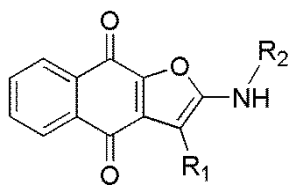
Una aplicación de este tipo de estudios se llevó a cabo en un trabajo publicado recientemente por Jiménez-Alonso y colaboradores.<sup>79</sup> Quienes sintetizaron una serie de amino-naftofuranoquinonas, donde el nitrógeno se encuentra conjugado al anillo quinónico por medio de un doble enlace (Figura 27). Se estudiaron las propiedades electrónicas de estas quinonas y su actividad citotóxica frente a varias líneas celulares de tumores humanos, encontrándose que a mayor grado de deslocalización electrónica de las moléculas, se observa una mayor actividad citotóxica.

---

<sup>77</sup>Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chem. Rev.* **1991**, 97, 165.

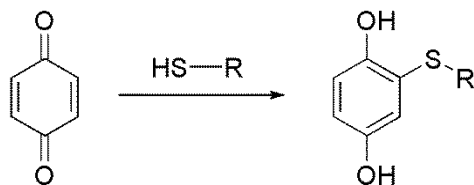
<sup>78</sup>Gómez-Sandoval, Z.; Calaminici, P.; Köster, A. M.; Lotina-Hennsen, B.; King-Díaz, B.; Macías-Ruvalcaba, N. M.; Aguilar-Martínez, M.; Jiménez-Estrada, M. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, 3, 894.

<sup>79</sup>Jiménez-Alonso, S.; Guasch, J.; Estévez-Braun, A.; Ratera, I.; Veciana, J.; Ravelo, A.J. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 1634.



**Figura 27. Estructura de furanamino-naftoquinonas antitumorales.**

Recientemente, la química verde ha tomado relevancia en diversas áreas de la química. En síntesis orgánica implica, entre otros aspectos, la búsqueda de medios de reacción distintos a los tradicionales, eliminando los solventes orgánicos.<sup>80</sup> Se ha reportado la síntesis de aminonaftoquinonas a través de sustituciones nucleofílicas en medio acuoso,<sup>81</sup> y de la misma forma, las reacciones de adición conjugada de tioles sobre quinonas, obteniéndose como productos la tiohidroquinonas correspondientes (Figura 28).<sup>82</sup>



**Figura 28. Adición oxidativa de tioles sobre quinonas en agua.**

#### 1.4. Química verde

En el año 2005 Yves Chauvin, Robert Grubbs y Richard Schrock recibieron el premio nobel de química por el desarrollo de la "metátesis de olefinas", una práctica metodología sintética que permite obtener dos nuevas olefinas a partir de otras dos en un solo paso. Una de las motivaciones para concederles el reconocimiento fue el impacto que tuvo el

<sup>80</sup> Anastas, P.T.; Kirchhoff, M.M. *Acc. Chem. Res.*; **2002**, 35, 686.

<sup>81</sup> Tandon, V.K.; Maurya, H.K. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 5896.

<sup>82</sup> Yadav, J.S.; Swamy, T.; Subba Reddy, B.V.; Krishna Rao, D. *J. Mol. Catal. A* **2007**, 274, 116.

descubrimiento en el desarrollo de una química más verde.<sup>83</sup> La química verde es transversal y puede implicar a todas las áreas de esta ciencia, así como también otras disciplinas científicas. Los principales tópicos de la química verde en la actualidad son: energía, seguridad alimentaria, tratamiento de la contaminación y manufacturas sostenibles. Este último tópico apunta a tres áreas principalmente: reactivos verdes, catalizadores verdes y medios alternativos de reacción. De esta forma, uno de los principales desafíos de la química verde es mejorar la sustentabilidad de las reacciones químicas, a través de la modificación de los procedimientos y condiciones de reacción. En el caso de los catalizadores, muchos esfuerzos se han llevado a cabo para lograr procesos industriales que trabajen con cantidades tan bajas como 0,1% de carga del catalizador. Sin embargo, incluso con estos avances, la proporción entre el material de desecho y los productos deseados en la industria química y farmacéutica está entre un 5-100%, donde buena parte de ese porcentaje está dado por el uso de los solventes orgánicos. La agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus sigla en inglés), reporta que alrededor de 100 mil millones de toneladas de desechos industriales son generados cada año.<sup>84</sup> El uso anual de solventes orgánicos ha sido valorado en más de 5 mil millones de dólares.<sup>85</sup>

Los solventes orgánicos comunes son mayormente compuestos orgánicos volátiles (Volatile Organic Compound, VOC) que tienen un negativo impacto ambiental, así como problemas de toxicidad e inflamabilidad. Un ejemplo típico de los problemas ambientales derivados del uso de VOC, es el agujero en la capa de ozono, el cual ha sido atribuido al uso de CFCs (clorofluorocarbonados). Hasta hace poco tiempo, limitados esfuerzos se habían realizado para disminuir el uso de solventes orgánicos, y reemplazarlos por medios

---

<sup>83</sup> [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)

<sup>84</sup> Nelson, W. M. *Green Solvents for Chemistry* **2003**, ed. Oxford University Press: New York.

<sup>85</sup> Seddon, K. R. J.; *Chem. Technol. Biotechnol.* **1997**, 68, 351.

más amigables con el ambiente.<sup>86</sup> Nuevos tratados internacionales como el protocolo de Montreal, están presionando para que se disminuya el uso de solventes dañino para el ambiente. Por lo mismo, las industrias están en la búsqueda de procesos más amigables ambientalmente y que presenten una buena relación costo-beneficio. Uno de los principales alternativas a los medios de reacción convencionales es el agua.

#### 1.4.1. El agua como medio de reacción sustentable

El agua es la molécula más abundante en el planeta y es el medio en cual ocurren la mayoría de los procesos de los seres vivos. Sin embargo, en la química orgánica moderna se consideraba, en general, como incompatible con las reacciones orgánica y pocas veces se consideró como medio de reacción. Sin embargo, esto no siempre fue así. La síntesis de Wöhler de la urea, llevada a cabo en 1828, y que comúnmente se considera el inicio de la química orgánica, fue llevada a cabo en medio acuoso.<sup>87</sup> De hecho, la mayoría de las reacciones orgánicas desarrolladas en el siglo 19 y principios del siglo 20, y que son parte de la base de la síntesis orgánica hasta nuestros días, tales como la oxidación de Baeyer-Villiger,<sup>88</sup> el reordenamiento de Curtius,<sup>89</sup> la eliminación de Hofmann<sup>90</sup> y la reducción de Wolff-Kischner<sup>91,92</sup> fueron llevadas a cabo originalmente en medio acuoso. El rápido cambio a solventes orgánicos que se produjo a principios del siglo 20, se debió principalmente al desarrollo de la química órgano-metálica. El enorme impacto que tuvo el

---

<sup>86</sup> Tanaka, K. *Solvent-Free Organic Synthesis* **2004**, ed. Wiley-VCH: Weinheim.

<sup>87</sup> Wöhler, F.; *Ann. Phys.* **1828**, 88, 253.

<sup>88</sup> Baeyer, A.; Villiger, V.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, 32, 3625.

<sup>89</sup> Curtius, T.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, 23, 3023.

<sup>90</sup> von Hofmann, A. W.; *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1851**, 78, 253.

<sup>91</sup> Kishner, N.; *J. Russ. Chem. Soc.* **1911**, 43, 582.

<sup>92</sup> Wolff, L.; *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1912**, 394, 86.

trabajo de Victor Grignard<sup>93</sup> llevó a desplazar el agua como medio de reacción. El potente nuevo método sintético empleando el reactivo de Grignard requería de solventes orgánicos y estos se encontraban rápidamente disponibles, gracias al desarrollo de la industria petroquímica. De esta forma, la mayoría de los métodos sintéticos desarrollados en el último siglo, utilizaron solventes orgánicos como medio de reacción. No fue hasta inicios de la década de 1980, cuando se retomó el interés en el agua como medio en síntesis orgánica, al observarse el efecto positivo que tenía el medio acuoso en la velocidad y selectividad de la reacción Diels-Alder, comparada con los solventes orgánicos en las mismas condiciones.<sup>94</sup> Además el agua presenta varias ventajas como tener un bajo costo económico, efectividad como medio de reacción, seguridad en su manejo y ausencia de toxicidad. Debido a estas características, el agua puede considerarse un medio de reacción verde.<sup>95</sup>

A pesar de las potenciales ventajas que posee el agua, aun no es comúnmente usado como solvente único en síntesis orgánica, en parte debido a que la mayoría de los compuestos orgánicos presentan una baja solubilidad en agua, siendo este parámetro, considerado en general, un requisito para que ocurra la reacción. De esta forma, en muchas reacciones en medio acuoso se emplean cosolventes orgánicos para ayudar a solubilizar las especies.<sup>96</sup> Otra alternativa ha sido incrementar la hidrofilia de los reactivos, introduciéndoles grupos polares para lograr, al menos, cierto grado de solubilidad en

---

<sup>93</sup> Grignard, V.; *Compt. Rend.* **1900**, 130, 1322.

<sup>94</sup> Rideout, D. C.; Breslow, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7816.

<sup>95</sup> Sheldon, R.A.; *Green Chem.* **2005**, 7, 267.

<sup>96</sup> Lindström, U.M.; *Chem. Rev.* **2002**, 102, 2751.

agua.<sup>97</sup> Sin embargo se ha visto que la solubilidad no es en realidad necesaria para la reactividad.<sup>98</sup> La manipulación involucrada en los procesos anteriores tiende a disminuir los beneficios del uso de agua como solvente, tales como bajo costo y simplicidad en las condiciones de reacción.

#### **1.4.2. Efectos del agua sobre las reacciones orgánicas**

Para explicar el efecto del agua en las reacciones orgánicas se pueden considerar dos casos extremos: uno en el cual los reactivos son solubles en agua (reacciones “*in water*”) y otro en el cual los reactivos son completamente insolubles (reacciones “*on water*”).

##### **1.4.2.1. Reacciones “*in water*”**

Las moléculas orgánicas pequeñas no iónicas, tienden a repeler el agua. Cuando son puestas en medio acuoso se ven forzadas a formar agregados con el fin de minimizar la superficie orgánica expuesta al agua.<sup>99</sup> Estos agregados causan agujeros en el empaquetamiento molecular del agua líquida y el agregado queda rodeado de moléculas de agua (Figura 29). En la capa final de la esfera de hidratación, como las moléculas de agua se aproximan a la superficie de los pequeños agregados, sus uniones por enlace de hidrógeno van lateralmente, a lo largo de la superficie hidrofóbica.<sup>100</sup>

---

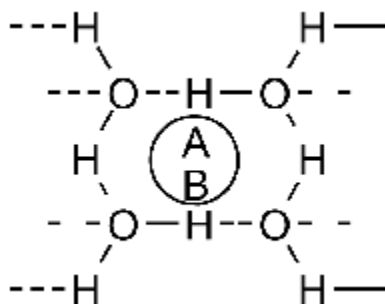
<sup>97</sup>Itami, K.; Yoshida, J.-I.; *Chem. Rec.* **2002**, 2, 213.

<sup>98</sup>Herrerías, C.I.; Yao, X.; Li, Z.; Li, C.-J.; *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2546.

<sup>99</sup>Breslow, R.; *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 159.

<sup>100</sup>Otto, S.; Engberts, J. B. F. N.; *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2809.





**Figura 29. Agregados hidrofóbicos pequeños en agua.**

Los agregados se mantienen juntos a causa de la interacción hidrofóbica, y cuando estos agregados están compuestos de los reactantes orgánicos (AB), dan lugar al efecto hidrofóbico en la reacción que resulta en la aceleración de la velocidad. El efecto de la interacción hidrofóbica es un fenómeno complicado, pero se han elaborado algunas aproximaciones para su comprensión. Los agregados forzados de moléculas orgánicas, se encuentran a mayor energía que las especies no agregadas y más cercanos en energía a los complejos activados del estado de transición de la reacción. Esto no tendría mayor relevancia, si los complejos activados aumentaran también su energía en la misma medida que el estado basal. Sin embargo, se ha demostrado que los sitios reactivos de estos complejos activados pierden completamente su carácter hidrofóbico, lo que redundaría en el resultado de la reacción y proporciona al agua un gran papel facilitador en la reacción.<sup>100</sup>

<sup>101</sup> Es por ello que las reacciones orgánicas que surgen de agregados hidrofóbicos en agua tendrán energías de activación reducidas y por tanto un significativo aumento en la velocidad. También, el efecto hidrofóbico puede tener una gran influencia en la estereoselectividad de las reacciones llevadas a cabo en agua. Por ej. en cicloadiciones Diels-Alder y 1,3-dipolares, se favorecen los productos provenientes del estado de

<sup>101</sup> Meijer, A.; Otto, S.; Engberts, J. B. F. N.; *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8989.

transición más compacto.<sup>102</sup> Cuando los reactantes orgánicos presentan grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, las moléculas de agua formaran los enlaces de hidrógeno con ellos. Estos enlaces pueden estar presentes tanto en el estado basal como en el estado de transición, afectando tanto la velocidad como la estereoselectividad de la reacción.<sup>103</sup>

#### 1.4.2.2. Reacciones "on water"

En los últimos años se han reportado distintos tipo de reacciones, donde reactivos insolubles en agua dan elevados rendimientos de productos cuando se usa agua pura, con agitación adecuada, como medio de reacción, y cuyos resultados han mostrador estar por sobre lo obtenido cuando se han realizado sin solvente.<sup>104</sup> <sup>105</sup> Dado que los reactivos son insolubles en agua, estas reacciones se han denominado "on water".<sup>106</sup> Se ha considerado los reactivos líquidos que se mantienen en una fase orgánica separada del agua, como ideales para reacciones "on water". Aunque también reacciones entre sólidos y líquidos inmiscibles en agua, provistos de fuerte agitación han sido utilizados, dando buenos resultados.<sup>107</sup> A pesar de que parece necesario el requerimiento de que al menos uno de los reactivos sea líquido, para que la reacción "on-water" funcione,<sup>107,108</sup> Butler y colaboradores han reportado reacciones de cicloadición entre sólidos suspendidos en agua, que efectivamente funcionan bien.<sup>109</sup> La eficiencia del tipo de mezcla parece jugar un rol

---

<sup>102</sup> (a) Breslow, R.; Maitra, U.; *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1239. (b) Breslow, R.; Rizzo, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4340. (c) Breslow, R.; Rizzo, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4340.

<sup>103</sup> (a) Chandrasekhar, J.; Shariffskul, S.; Jorgensen, W. L.; *J. Phys. Chem.B* **2002**, 106, 8078. (b) Acevedo, O.; Jorgensen, W. L.; *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, 3, 1412.

<sup>104</sup> Narayan, S.; Muldoon, J.; Finn, M. G.; Fokin, V. V.; Kolb, H. C.; Sharpless, K. B.; *Angew. Chem.; Int. Ed.* **2005**, 44, 3275.

<sup>105</sup> Zhang, H.-B.; Liu, L.; Chen, Y.-K.; Wang, D.; Li, C.-J.; *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4.

<sup>106</sup> Butler, R.N.; Coyne, A.G.; *Chem. Rev.* **2010**, 110, 6302.

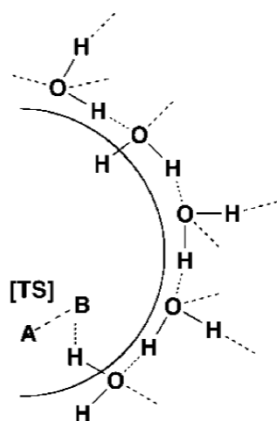
<sup>107</sup> Pirrung, M. C.; Sarma, K. D.; Wang, J. M.; *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 8723.

<sup>108</sup> Klijn, J. E.; Engberts, J. B. F. N.; *Nature* **2005**, 435, 746.

<sup>109</sup> Butler, R. N.; Coyne, A. G.; Moloney, E. M.; *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3501.

importante en esta clase reacciones.<sup>110</sup> Recientemente, se ha propuesto que la clave para entender lo que ocurre en las reacciones "on-water" es la química que ocurre en la particular interfaz entre el agua y los reactivos no disueltos.<sup>111</sup>

Con superficies hidrofóbicas grandes, grupos -OH libres se orientan hacia la barrera de la interfaz, para minimizar la densidad de empaquetamiento de las moléculas (Figura 30).<sup>112</sup> El movimiento traslacional de las moléculas de agua está muy limitado cerca de la interfaz, pero aun ocurren saltos reorientacionales de algunas moléculas de agua.<sup>113</sup>



**Figura 30. Agregados hidrofóbicos grandes**

Para estudiar la reactividad química, se han desarrollado múltiples herramientas provenientes de la química teórica. A continuación se presentan parte de sus fundamentos y métodos útiles en el estudio de reactividad química.

<sup>110</sup> Pirrung, M. C.; Sarma, K. D.; Wang, J. M.; *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 8723.

<sup>111</sup> Jung, Y. S.; Marcus, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5492.

<sup>112</sup> Scatena, L. F.; Brown, M. G.; Richmond, G. L.; *Science* **2001**, 292, 908.

<sup>113</sup> Bakulin, A. A.; Liang, C.; Jansen, T. L. C.; Wiersma, D. A.; Bakker, H. J.; Pshenichnikov, M. S.; *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 1229.

## 1.5. Química teórica

### 1.5.1. Mecánica cuántica

Los cálculos mecano-cuánticos constituyen una importante herramienta para el estudio de la estructura electrónica de átomos y moléculas, a partir de ellos se puede predecir cualquier variable del sistema. Para describir el estado de un sistema no relativista en mecánica cuántica se postula la siguiente ecuación diferencial:

$$\hat{G}\Psi = \gamma\Psi \quad (1)$$

Donde  $\hat{G}$  es un operador,  $\Psi$  es una función que contiene toda la información del sistema, conocida como función de onda y  $\gamma$  es el valor propio del operador (observable). Cuando se utiliza el operador Hamiltoniano  $H$ , asociado a la energía de los núcleos y electrones, se obtiene la energía total del sistema como valor propio. Si la energía potencial del sistema no depende del tiempo, el sistema puede estar en uno de sus estados estacionarios de energía constante. Para obtener la energía de estos estados, se utiliza la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:<sup>114</sup>

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2)$$

El hamiltoniano se construye considerando la energía cinética y potencial, tanto de los electrones como de los núcleos. De esta forma, tenemos:

---

<sup>114</sup> Schrödinger, E. *Ann. Physik.* **1926**, 79, 361.

$$(\hat{T}_N + \hat{T}_e + \hat{V}_{NN} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{eN})\Psi = E\Psi \quad (3)$$

Donde  $\hat{T}_N$  representa la energía cinética de los núcleos,  $\hat{T}_e$  la energía cinética de los electrones,  $\hat{V}_{NN}$  la energía de interacción núcleo-núcleo,  $\hat{V}_{ee}$  la energía de interacción electrón-electrón y  $\hat{V}_{eN}$  la energía de interacción núcleo-electrón.

La ecuación de Schrödinger solo se puede resolver analíticamente para el átomo de hidrogeno monoeléctrico. Para sistemas multi-eletrónicos se hace necesario el uso de aproximaciones.

La aproximación de Born-Oppenheimer, que se aplica sobre el hamiltoniano, simplifica el problema considerando que los núcleos están prácticamente inmóviles respecto a los electrones, debido a su mayor masa. Por lo tanto, el movimiento de los electrones se asocia a una geometría nuclear fija, y cuando esta cambia, los electrones se ajustan instantáneamente a esta nueva geometría nuclear. De esta forma, la variable de energía cinética de los núcleos en el hamiltoniano se anula,  $\hat{T}_N = 0$  y la variable que representa a la energía de repulsión núcleo-núcleo ( $\hat{V}_{NN}$ ) se vuelve una constante. El problema se simplifica entonces a uno puramente electrónico, aunque válido únicamente para una geometría nuclear fija. Aparece de esta forma el concepto de superficies de energía potencial (SEP) constituidas por los valores propios de las energías resultantes para cada geometría nuclear.

A pesar de la aproximación de Born-Oppenheimer, la ecuación de Schrödinger sigue siendo imposible de resolver en forma exacta para sistemas multielectrónicos debido a la repulsión electrón-electrón.

### **1.5.2. Métodos de cálculos**

Existen distintos métodos de cálculos, con distinto nivel de aproximación matemática. La elección de uno u otro depende del problema estudiado, del nivel de precisión requerido y de la disponibilidad material que se tiene. Se debe ser capaz de evaluar el alcance y las limitaciones de cada método, para aplicar el más adecuado al problema y obtener resultados que tengan sentido con lo que muestran resultados experimentales.

Los métodos más importantes que se usan en la actualidad son aquellos conocidos como métodos *Ab-initio* y métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT).

#### **1.5.2.1. Métodos *Ab-initio***

Estos métodos realizan los cálculos basados únicamente en las leyes de la mecánica cuántica y valores de las constantes fundamentales. Como habíamos mencionado previamente, el término de repulsión electrónica es el que hace imposible resolver la ecuación de Schrödinger de manera exacta para sistemas multi-electrónicos. La imposibilidad de conocer la posición relativa de los electrones, en forma previa a la resolución de la ecuación, es lo que impide la resolución analítica del problema.

La primera aproximación que se introdujo para resolver el inconveniente de la repulsión electrónica fue separar la función de onda multi-electrónica, en un producto de n funciones de onda mono-electrónicas. Esto se conoce como la aproximación orbital.<sup>115</sup>

$$\Psi_N(r_1 \dots r_n) = \prod_n^{i=1} \Psi_i(r_i) \quad (4)$$

A estas funciones de onda mono-electrónicas se les introduce el espín de la siguiente forma:

$$\Psi_\alpha(r) = \varphi(r) \alpha(s) \quad (5)$$

$$\Psi_\beta(r) = \varphi(r) \beta(s) \quad (6)$$

Donde  $\alpha(s)$  y  $\beta(s)$  son las funciones de espín, y la función resultante se conoce como espín-orbital:

$$\Psi_N(r_1, \dots, r_n) = \prod_N^{i=1} \Psi_\alpha(r_i) \Psi_\beta(r_i) \quad (9)$$

Esta aproximación causa que se pierda la correlación electrónica.

La función espín-orbital (9) es simétrica respecto al intercambio electrónico, es decir, la permutación de dos electrones mantiene el signo de la función de onda. Como los electrones son fermiones, la función de onda debe ser antisimétrica respecto al intercambio. Para satisfacer esta condición, Slater expresó la función de onda como un determinante.

---

<sup>115</sup> Hartree, D. R.; *Proc. Cambridge Phil. Soc.* **1928**, 24, 89.

$$\Psi(r_1, r_2) = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} \phi(1)\alpha(1) & \phi(1)\alpha(1) \\ \phi(2)\alpha(2) & \phi(2)\alpha(2) \end{pmatrix} \quad (10)$$

De esta forma, si se permuta el electrón 2 por el 1, el determinante cambia de signo y por lo tanto la función de onda resulta antisimétrica.

#### 1.5.2.1.1. Método Hartree-Fock (HF)

El método de Hartree-Fock intenta resolver la ecuación de Schrödinger con el determinante de Slater siguiendo el principio variacional, que establece que la energía calculada para una función de onda cualquiera, siempre será mayor que la energía obtenida con la función de onda correcta. De esta forma se tiene una guía que permite ir variando una función de onda arbitraria inicial para acercarla cada vez más a la correcta. Si la variación de la función de onda produce una disminución de la energía, entonces está más próxima a ser la correcta.

Cada uno de los orbitales de la función de onda de prueba se construye como una combinación lineal de funciones de onda mono-electrónicas multiplicada por sus respectivos coeficientes. Variando los coeficientes, se pueden ir variando la función de onda de prueba hasta acercarse a la energía mínima.<sup>116</sup> Tenemos entonces unas ecuaciones, conocidas como ecuaciones de HF, que tienen la siguiente forma:

$$\hat{F} \Psi_i = \varepsilon_i \Psi_i \quad (11)$$

---

<sup>116</sup> Roothaan, C.C.; *J. Rev. Mod. Phys.* **1951**, 23, 69



Donde  $\hat{F}$  se conoce como el operador de Fock,  $\Psi_i$  es la función de onda mono-electrónica para el orbital  $i$  y  $\epsilon_i$  es el valor propio de la energía para el orbital  $i$ . La resolución de estas ecuaciones se realiza mediante un método iterativo. Las funciones mono-electrónicas están acopladas entre sí, ya que en el operador de Fock aparecen operadores de repulsión coulombianas  $J_i(r)$  y de intercambio  $K_i(r)$ , que dependen a su vez del resto de los electrones.

$$\hat{F} = -\frac{1}{2}\nabla^2 - \sum_a \frac{Z_a}{|r - r_a|} + \sum_j [J_j(r) - K_j(r)] \quad (12)$$

$$J_j(r) = \int \frac{X_j^\circ(r) X_j(r)}{|r - r'|} dr' \quad (13)$$

$$K_j(r) = \int \frac{X_j^\circ(r) X_j(r)}{|r - r'|} dr' \quad (14)$$

Una limitación del método HF es que, al no incluir toda la correlación electrónica, no es posible obtener la solución real. De esta forma, se define a la diferencia entre la energía HF real y calculada, como energía de correlación.

$$E_{\text{corr}} = E_{\text{HF}} - E \quad (15)$$

Para superar esta limitación de los métodos HF, se han desarrollado métodos ab-initio que consideran esta energía de correlación, los cuales se han denominado genéricamente como métodos post-HF. Estos métodos parten con el modelo HF y se le añaden correcciones, ya

sea de tipo variacional o perturbatorio.<sup>117</sup> Dependiendo de la función de onda tomada como punto de partida, se distingue entre métodos mono y multi-configuracionales.<sup>118</sup>

### 1.5.2.2. Conjunto de funciones base

La experiencia química nos indica que es más probable encontrar un electrón cercano a un núcleo que alejado de ellos. Esto se tiene en cuenta para buscar la función de onda de prueba en las ecuaciones HF. Para ello, la función se descompone en un conjunto de funciones base centradas en los núcleos, tratando que el conjunto sea lo más completo posible, de modo que con una combinación adecuada se pueda reproducir de forma precisa cualquier función de onda. Si utilizáramos un conjunto infinito de funciones base, obtendríamos la solución exacta dentro del método de cálculo usado. Debido a que lo anterior es imposible de lograr, en la práctica se utilizan conjuntos finitos de funciones base. Existen distintos tipo de funciones base, a continuación se presentan las más comunes.

- Funciones Gaussianas (GTO, Gaussian-Type Orbitals)<sup>119</sup>. Pueden representarse genéricamente por medio de la siguiente expresión:  $\chi = Nr^{n-1}e^{-\alpha r^2} Y$ . Donde N es una constante de normalización, r es el radio del orbital,  $\alpha$  es un exponente orbital positivo, Y es el armónico esférico y  $n = 0,1,2\dots$  es un número cuántico principal efectivo. La ventaja principal de este tipo de funciones es que el producto de dos gaussianas con diferente centro, da como resultado una nueva gaussiana centrada en

---

<sup>117</sup>Møller, C.; Plesset, M. S.; *Phys. Rev.* **1934**, 46, 618.

<sup>118</sup>Meckler, A.; *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 1750.

<sup>119</sup>Boys, S.F.; *Proc. R. Soc.* **1950**, 542, A200.

un punto intermedio entre los dos centros. Esto lleva a que integrales bielectrónicas sobre tres o cuatros diferentes centros atómicos, puedan ser reducidas a integrales sobre solo dos centros atómicos, lo que facilita su cálculo. El principal inconveniente de este tipo de funciones, es que dan una pobre representación de los orbitales en los núcleos atómicos.

- Funciones tipo Slater (STO, Slater-Type Orbitals). Se pueden representar con la siguiente expresión genérica:  $\chi = N r^{n-1} e^{-ar} Y$ . La diferencia entre STOs y GTOs está en el término exponencial, que en las GTOs está elevado al cuadrado. Estas funciones fueron las primeras en usarse y representan de mejor manera los orbitales que las GTOs. El principal inconveniente que tienen las funciones STOs es que su resolución implica un consumo elevado tiempo de cálculo.

Una solución a las desventajas de ambos tipos de funciones es el empleo de gaussianas contraídas, que se construyen como una combinación lineal de GTOs (llamadas en este caso gaussianas primitivas o simplemente primitivas), y que se aproximan a la forma de las funciones STOs pero a un menor costo de cálculo. La notación comúnmente usada tiene la siguiente forma STO-NG, donde N representa el número de primitivas usadas para construir cada gaussiana contraída tipo STO. Un ejemplo es STO-3G, gaussiana contraída tipo STO formada por tres primitivas.

Existen distintas formas de construir las funciones base, dependiendo del número de funciones por orbital atómico. A continuación se muestran las principales:

- **Funciones de base mínima.** En este caso, cada OA está representado por una sola función base. Por ejemplo una función STO-3G para cada orbital atómico. En general, las funciones base mínima dan pobres resultados.
- **Funciones N-Zeta.** Para mejorar las funciones de base mínima, se aumenta el tamaño de la base reemplazando cada función del conjunto mínimo por N funciones.
- **Funciones de valencia desdoblada** (SP, *split-valence*). En este caso se hace una diferencia entre los electrones de valencia y los internos (electrones core). Los orbitales que contienen electrones internos se representan por una sola función base (base mínima), de tipo gaussiana contraída. Mientras que los de valencia se representan por funciones base N-Zeta (DZ, TZ, etc.). Las funciones base SP se representan de esta manera (suponiendo una función doble-Z para los orbitales de valencia): K-LMG, donde K, L y M representan números enteros. K es el número de primitivas con que se forman las gaussianas contraídas para los orbitales internos. L y M indican que los orbitales de valencia se representan como funciones doble-zeta (dos gaussianas contraídas) formadas de L primitivas la primera y M primitivas la segunda. Si los orbitales de valencia se representan por funciones triple-Z, la notación sería K-LMNG, donde N es el número de primitivas de la tercera gaussiana contraída. De esta forma, una función base comúnmente usada, 6-31G, indica que los orbitales internos se representan por una gaussiana contraída formada por 6 primitivas y los orbitales de valencia se representan por dos

gaussianas contraídas, una formada por tres primitivas y otra formada por una primitiva

- **Funciones polarizadas.** Contienen funciones con momento angular mayor para los OA de los electrones de valencia (funciones p, d, etc.), lo que permite cambiar la forma del orbital. Estas funciones se denotan añadiendo uno o dos asteriscos al final de la notación K-LMG. Un asterisco indica la adición de funciones polarizadas a los átomos pesados (todos excepto el H), y un segundo asterisco indica que también se le añaden a los átomos de H. Algunas veces se reemplaza los asteriscos por un paréntesis con los tipos de orbitales adicionados, por ejemplo  $6-31G^{**} = 6-31G(d,p)$ .
- **Funciones difusas.** Este tipo de funciones poseen exponentes mayores, que permiten el aumento de la densidad electrónica a mayores volúmenes. Son particularmente útiles en la descripción de aniones, moléculas con pares de electrones libres y enlaces de hidrógeno, que tienen densidad electrónica significativa a grandes distancias de los núcleos. Se denotan añadiendo un signo + antes de la G para indicar que se aplica a los átomos pesados y ++ cuando se aplican también sobre los átomos de hidrógeno.

Los conjuntos de funciones base que vimos hasta ahora se optimizaron sin tomar en consideración la correlación electrónica. Para los casos en que se requiere tener en cuenta la correlación electrónica, se han desarrollado las funciones base de correlación consistente. Para los casos en que la correlación solo es importante en los electrones de valencia, tenemos las cc-pVXZ, que quiere decir *correlación consistente con funciones N-Zeta de*

*valencia polarizada*. Si es necesario incluir la correlación de los electrones internos, tenemos las cc-pCVNZ, que quiere decir *correlación consistente con funciones core y N-Zeta de valencia polarizada*. La adición de funciones difusas, polarizadas y no polarizadas da lugar a las series aumentadas aug-cc-pVXZ y aug-cc-pCVNZ.

### 1.5.3. Método de la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT)

La DFT es un método alternativo y conceptualmente distinto a los métodos basados en la función de onda poli-electrónica  $\Psi$ . Fue desarrollada por Hohenberg y Kohn,<sup>120</sup> y fundamentalmente se trata de un método que permite calcular la energía y cualquier otra propiedad de un sistema electrónico, sin necesidad de usar el hamiltoniano y sin conocer la función de onda. Este es posible, en principio, a partir de la densidad electrónica  $\rho(r)$ , la cual se define de la siguiente manera:

$$\rho(r) = N \sum_s \iint \dots \int |\Psi|^2 dr_2 dr_3 \dots dr_N \quad (16)$$

Donde la sumatoria simboliza la suma sobre todas las variables de espín. La densidad, definida de esta manera, representa la probabilidad de encontrar una cierta cantidad de electrones en un elemento de volumen dado. Esta función entonces, es siempre una función dependiente de solo tres variables, independiente del número de electrones que tenga el sistema. De esta manera una diferencia notable con los métodos basados en la función de onda poli-electrónica, es que estos últimos dependen de  $3N_e$  variables, donde  $N_e$  es el número de electrones del sistema.

---

<sup>120</sup> Hohenberg, P.; Kohn, W.; *Phys. Rev.* **1964**, 136, B864.

La base formal de la DFT son los teoremas de Hohenberg y Kohn, que se presentan a continuación:

**Primer teorema.** Muestra que la densidad electrónica determina el hamiltoniano y por lo tanto todas las propiedades del sistema.

Escribiendo el hamiltoniano de la siguiente manera

$$H = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla^2 + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j}^N \frac{1}{r_{ij}} + V_{ext} \quad (17)$$

Tenemos el primer término que es la energía cinética de los electrones, el segundo que es la energía de repulsión electrón-electrón y  $V_{ext}(r)$  que es el potencial externo, el cual en ausencia de campos externos, es la interacción núcleo-electrón. Los dos primeros términos son iguales para cualquier sistema, y solo varía el número de electrones  $N$ . Como la densidad electrónica normaliza a  $N$ :

$$\int \rho(r) dr = N \quad (18)$$

Entonces  $\rho(r)$  determina los dos primeros términos del hamiltoniano y solo queda establecer si  $\rho(r)$  determina también el  $V_{ext}$ .

Precisamente, el primer teorema de Hehenberg y Kohn establece que *el potencial externo  $V_{ext}$  es una única funcional de la densidad electrónica  $\rho(r)$  y a su vez, fija el hamiltoniano, concluyéndose que el estado fundamental completo es una única funcional de  $\rho(r)$ .*

Por lo tanto, la energía del estado fundamental  $E_0$  es una funcional de la densidad electrónica  $\rho^\circ(r)$ . El término funcional  $F[f(x)]$ , hace referencia a un algoritmo matemático  $F$ , que aplicado a una función  $f(x)$ , de cómo resultado un número.

Segundo teorema. Establece que *para una densidad cualquiera  $\rho^\circ(r)$ , que satisface las condiciones  $\rho^\circ(r) \geq 0$  y  $\int \rho^\circ(r) d(r) = N$ , se cumple la desigualdad:*

$$E_0 < E_v[\rho^\circ(r)] \quad (19)$$

La cual es un principio variacional aplicado a la funcional de energía  $E_v[\rho^\circ(r)]$ . Tiene la siguiente forma:

$$E_v[\rho^\circ(r)] = \int \rho^\circ(r) v(r) dr + F_{HK}[\rho^\circ(r)] \quad (20)$$

Donde el primer término es la energía debido al potencial externo y el segundo es la funcional de Hohemberg-Kohn ( $F_{HK}$ ) que contiene la funcional de la energía cinética y de la interacción electrón-electrón:

$$F_{HK}[\rho(r)] = T[\rho(r)] + E_{ee}[\rho(r)] \quad (21)$$

Esta funcional es universal para cualquier sistema.



El principio varicinal aplicado sobre  $E_v[\rho^\circ(r)]$ , requiere que la densidad del estado fundamental satisfaga el principio estacionario:

$$\frac{\delta}{\delta\rho^\circ(r)} \left\{ E_v[\rho^\circ(r)] - \mu \left( \int \rho^\circ(r)v(r)dr - N \right) \right\} = 0 \quad (22)$$

Lo que genera la ecuación de Euler-Lagrange:

$$\mu = \frac{\delta}{\delta\rho^\circ(r)} E_v[\rho^\circ(r)] = v(r) + \frac{\delta}{\delta\rho^\circ(r)} F_{HK}[\rho^\circ(r)] \quad (23)$$

De esta manera, los teoremas de Hohenberg y Kohn muestran que se puede obtener la energía y la densidad electrónica de un sistema, resolviendo la ecuación de Euler respectiva. Sin embargo, los teoremas no muestran una forma explícita de construir la  $F_{HK}$ . Por ello, Kohn y Sham<sup>121</sup> propusieron una forma de resolver el problema a través de unas ecuaciones con la misma estructura que las ecuaciones de Hartree-Fock:

$$\left( -\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{\text{eff}}(r) \right) \phi_i(r) = \epsilon_i \phi_i(r) \quad (24)$$

Estas ecuaciones se conocen como las ecuaciones de Kohn y Sham (KS). La densidad electrónica exacta del sistema viene dada por:

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N |\phi_i(r)|^2 \quad (25)$$

---

<sup>121</sup>Kohn, W.; Sham, L. J.; *Phys. Rev.* **1965**, 140, A1133.

$\phi_i(\mathbf{r})$  son los orbitales de Kohn y Sham y  $\epsilon_i$  el valor propio de la energía, ninguno de ellos tiene sentido físico.  $v_{\text{eff}}(\mathbf{r})$  es un potencial efectivo, que contiene la funcional de intercambio y correlación  $E_{\text{xc}}$ . La resolución de las ecuaciones de Kohn y Sham se realiza de manera iterativa, análogamente a las ecuaciones de Hartree-Fock.

En la práctica, el impedimento para conocer la solución exacta dentro del método, está en la  $E_{\text{xc}}$ , que es desconocida. Se han desarrollado diferentes maneras de aproximar una solución para esta funcional, dependiendo del modo como tratan los componentes de intercambio y correlación. La aproximación de la densidad local<sup>122</sup> (LDA, *Local Density Aproximation*), asume que los efectos de intercambio y correlación son locales, es decir que el intercambio y correlación en un punto  $\mathbf{r}$  dependen únicamente del valor de la densidad en ese punto (valor local).

En los sistemas moleculares, la densidad electrónica es poco uniforme y puede variar bruscamente (como ocurre cerca de los núcleos). Así entonces, la aproximación LDA presenta serias limitaciones para describir estos sistemas de buena manera. Por ello, se desarrolló una aproximación más adecuada, que toma en cuenta tanto el valor local de la densidad electrónica como también su razón de cambio en ese punto. Esta aproximación se conoce como aproximación de gradiente generalizado<sup>48</sup> (GGA, *Generalized Gradient Aproximation*).

La  $E_{\text{xc}}^{\text{GGA}}$  generalmente se separa como en una funcional de intercambio y una de correlación, la cuales se modelan por separado. Dentro de las funcionales de intercambio

---

<sup>122</sup>Parr, R.G.; Yang, W.; *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1995**, 46, 701.

GGA, la más usada ha sido la de Becke,<sup>123</sup> abreviada comúnmente como *B*, la cual incorpora un único parámetro empírico que fue optimizado para corresponder exactamente con la energía de intercambio de seis átomos de gas noble (He hasta Rn). Una funcional de correlación muy popular es la de Lee, Yang y Parr,<sup>124</sup> abreviada como LYP, que incorpora cuatro parámetros empíricos optimizados para corresponder con el átomo de Helio. Este es el único funcional de correlación que consigue la cancelación exacta del error de auto-interacción en sistemas poli-electrónicos.

Comúnmente la especificación completa del funcional de intercambio y correlación, se realiza uniendo los dos acrónimos en ese orden. De esta forma, por ejemplo, un cálculo BLYP combina el funcional de intercambio de Becke con el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr.

Un avance importante sobre funcionales en DFT, fue el desarrollo de funcionales híbridos.<sup>125</sup> En ellos se incorpora una parte exacta de la energía de intercambio HF, a los funcionales de intercambio y correlación GGA, así como también energías provenientes de otros métodos (Ab-initio, LDA, etc.). Uno de los funcionales híbridos más utilizados en los últimos años es el B3LYP,<sup>126</sup> donde el número 3 indica que se incorporaron tres parámetros empíricos al funcional de Becke.

---

<sup>123</sup>Becke, A.D.; *Phys. Rev. A***1988**, 38, 309.

<sup>124</sup>Yang, C.L.W.; Parr, R.G.; *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785.

<sup>125</sup>Becke, A.D.; *J. Chem. Phys.***1993**, 98, 1372.

<sup>126</sup>Stephens, P.J.; Devlin, F.J.; Chabalowski, C.F.; Frisch, M.J.; *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11623.

Los métodos con funcionales híbridos tienden a dar buenos resultados con costos computacionales relativamente bajos, comparados con otros métodos de similar precisión. Una característica sistemática de los métodos híbridos, es que tienden a subestimar las barreras energéticas de las reacciones químicas. Otra particularidad de estos métodos, es que el aumento del tamaño del conjunto de funciones base no siempre mejora la precisión de los resultados, aunque si da lugar a predicciones convergentes.

#### 1.5.4. Estimación teórica de la reactividad

##### 1.5.4.1. DFT conceptual

###### 1.5.4.1.1. Propiedades globales

La DFT conceptual nace de la interpretación del multiplicador de Lagrange ( $\mu$ ) presente en la ecuación de Euler-Lagrange (E23) como análogo al potencial químico termodinámico, pero en este caso electrónico.<sup>127</sup> La electronegatividad ( $\chi$ ) definida como el negativo del potencial químico electrónico,<sup>128</sup> representa la variación de la energía total ( $E$ ) con respecto al número de electrones ( $N$ ), a potencial constante ( $v$ ):

$$\chi = -\mu = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_v \quad (26)$$

De la misma forma, la densidad electrónica, se define como la derivada de la energía con respecto al potencial, con el número de electrones constante:

---

<sup>127</sup> Parr, R. G.; Donnelly, R. A.; Levy, M.; Palke, W. E.; *J. Chem. Phys.* **1978**, 68, 3801.

<sup>128</sup> Parr, R. G.; Pearson, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7512.

$$\rho = \left( \frac{\delta E}{\delta v} \right)_N \quad (27)$$

La dureza ( $\eta$ ) ha sido definida como la segunda derivada de la energía respecto al número de electrones:<sup>129</sup>

$$\eta = \left( \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_v = \left( \frac{\partial \mu}{\partial N} \right)_v \quad (28)$$

Usando el método de diferencias finitas, se obtienen las ecuaciones operacionales para el potencial químico electrónico y la dureza:

$$\chi = \frac{I + A}{2} \quad (29)$$

$$\eta = I - A \quad (30)$$

Donde I y A son el potencial de ionización y la electroafinidad respectivamente. Usando el teorema de Koopman,<sup>130</sup> el potencial de ionización se puede aproximar a la energía del HOMO ( $-\epsilon_H$ ) y la electroafinidad a la energía del lomo ( $-\epsilon_L$ ):

$$\chi = -\frac{\epsilon_H + \epsilon_L}{2} \quad (31)$$

$$\eta = \epsilon_L - \epsilon_H \quad (32)$$

Parr et al.<sup>131</sup> han definido un índice de electrofilia a partir del potencial químico electrónico y la dureza:

<sup>129</sup> Parr, R. G.; Yang, W.; *Density Functional Theory of Atoms and Molecules* **1989**; Oxford University Press: Oxford, U.K.

<sup>130</sup> Pearson, R. G.; *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 734.

<sup>131</sup> Parr, R. G.; Szentpály, L. v.; Liu, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1922.

$$\omega = \frac{\mu^2}{\eta} \quad (33)$$

Esta propiedad es una medida del poder electrofílico de una molécula. Se puede establecer una analogía con el concepto de potencia (P) en electrostática clásica. Observando una de las definiciones operacionales,  $P = V^2/R$ , vemos que  $\mu$  es análogo al potencial eléctrico V y  $\eta$  es análogo a la resistencia eléctrica R.

De la misma forma que para la reactividad electrofílica se ha desarrollado la electrofilia global, también se ha buscado un descriptor para la reactividad nucleofílica. En el caso de la nucleofilia global (N), se han llevado a cabo varias aproximaciones para calcularla, sin haber llegado a una fórmula que funcione en todos los casos. Chattaraj et al.<sup>132</sup> han propuesto obtener el valor de la nucleofilia como el inverso de la electrofilia (I). Recientemente, se han propuesto nuevas ecuaciones para obtener la nucleofilia. Contreras y col. proponen calcular la nucleofilia como la diferencia entre la energía del HOMO del nucleófilo y la energía del HOMO del compuesto tetracianoetileno (TCE) (II).<sup>133</sup> La elección del TCE se debe a que presenta la menor energía del HOMO, dentro de una larga lista de compuestos que se consideraron para ser tenidos como referencia. Pratihari y Roy,<sup>134</sup> proponen calcular la nucleofilia como el inverso multiplicativo del poder electrodonante (III y IV), que había sido desarrollado previamente por Gazquez et al.<sup>135</sup>

---

<sup>132</sup> Chattaraj, P.K.; Maiti, B.; *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105,169.

<sup>133</sup> (a) Contreras, R.; Andrés, J.; Safont, V.S.; Campodonico, P.; Santos, J.G.; *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 5588.

<sup>134</sup> Pratihari, S.; Roy, S.; *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4957.

<sup>135</sup> Gazquez, J. L.; Cedillo, A.; Vela, A.; *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 1966.

$$\text{Método 1} \quad N_I = \frac{1}{\omega} \quad (34)$$

$$\text{Método 2} \quad N_{II} = E_H(nu) - E_H(TCE) \quad (35)$$

$$\text{Método 3} \quad N_{III} = \frac{2(I-A)}{I^2} \quad (36)$$

$$\text{Método 4} \quad N_{IV} = \frac{16(I-A)}{(3I-A)^2} \quad (37)$$

Donde I y A se pueden aproximar a la energía del HOMO y del LUMO, como vimos anteriormente.

#### 1.5.4.1.2. Propiedades locales

Las propiedades globales están definidas considerando las moléculas como un todo. Para describir la reactividad de fragmentos dentro de la molécula, se han desarrollado descriptores locales de la reactividad. El principal descriptor de la reactividad local es la función de Fukui ( $f$ ),<sup>136</sup> definida en términos tanto de la densidad electrónica ( $\rho$ ) como del potencial químico ( $\mu$ ):

$$f = \left( \frac{\delta\mu}{\delta v} \right)_N = \left( \frac{\partial\rho}{\partial N} \right)_v \quad (38)$$

Debido a la discontinuidad de la pendiente de la curva de  $\rho$  versus  $N$ ,<sup>137</sup> se han desarrollado tres tipos de funciones Fukui, una para el ataque nucleofílico ( $f^+$ ), otra para el ataque electrofílico ( $f^-$ ) y una para el ataque radicalario ( $f^0$ ):<sup>132</sup>

$$f^+ = \left( \frac{\partial\rho}{\partial N} \right)_v^+ \approx \rho_{N+1} - \rho_N \approx \rho_{LUMO} \quad (39)$$

<sup>136</sup> Parr, R. G.; Yang, W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4049.

<sup>137</sup> Perdew, J. P.; Parr, R. G. Levy, M.; Balduz, J. L.; *Phys. Rev. Lett.* **1982**, 49, 1691.

$$f^- = \left( \frac{\partial \rho}{\partial N} \right)_v^- \approx \rho_N - \rho_{N-1} \approx \rho_{HOMO} \quad (40)$$

$$f^0 = \frac{1}{2} [f^+ + f^-] \quad (41)$$

La condensación sobre sitios específicos de una molécula da lugar las funciones de Fukui condensadas ( $f_k^+$ ,  $f_k^-$ ,  $f_k^0$ ). Por otro lado, se ha desarrollado un descriptor de electrofilia local ( $\omega_k$ ) a partir de la función de Fukui condensada para el ataque nucleofílico:<sup>138</sup>

$$\omega_k = \omega f_k^+ \quad (42)$$

Durante la interacción nucleófilo-electrófilo, cuando los dos reactantes se aproximan desde larga distancia, solo sienten el efecto de la electrofilia global y no de la local. La molécula con mayor  $\omega$  actuará como electrófilo, mientras que la otra lo hará como nucleófilo. El sitio de reacción preferido, que determinará la regioselectividad en caso que ambas moléculas sean asimétricas, dependerá de la electrofilia local en el electrófilo y de la nucleofilia local en el nucleófilo.

#### 1.5.4.2. Potencial electrostático molecular

El potencial electrostático molecular (MEP)<sup>139</sup> es un observable experimentalmente (por ejemplo, por difracción de rayos X) y se puede derivar directamente de la función de onda. Se puede interpretar pensando en que una molécula cualquiera genera un potencial alrededor de sí misma que puede sentir una carga puntual positiva de prueba, que se aleja o

<sup>138</sup> (a) Pérez, P.; Toro-Labbe', A.; Aizman, A.; Contreras, R.; *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4747. (b) Chamorro, E.; Chattaraj, P. K.; Fuentealba, P.; *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 7068. (b) Szabó, G.N.; Ferenczy, G.G.; *Chem. Rev.* **1995**, 95, 829.

<sup>139</sup>(a) Scrocco, E.; Tomasi, J.; *Fortschr. Chem. Forsch.* **1973**, 42, 95. (b) Scrocco, E.; Tomasi, J. Adu.; *Quantum Chem.* **1978**, 11, 115.



se acerca a una región donde el MEP es negativo o positivo, respectivamente. El cálculo del potencial puede ser obtenido relativamente rápido de la función de onda, y se puede representar en mapas de color, bi- o tridimensionales, alrededor de la molécula. El potencial  $V(r)$  en un punto  $r$  de un sistema molecular con carga nuclear  $\{Z_A\}$  localizado en  $\{R_A\}$ , y con una densidad electrónica  $\rho(r)$  está dado por:

$$V(r) = \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{|r - R_A|} - \int \frac{\rho(r_i)d^3r_i}{|r - r_i|} \quad (43)$$

Donde  $N$  representa el número total de núcleos en la molécula. El MEP se ha utilizado extensamente para estudiar el enlace de hidrógeno,<sup>140</sup> reactividad<sup>141</sup> y correlacionar la actividad biológica con la estructura de las moléculas.<sup>142</sup>

---

<sup>140</sup>(a) Kenny, P.W.; *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 1234. (b) Mata, I; Molins, E; Alkorta, I; Espinosa, E.; *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 6425.

<sup>141</sup>(a) Wilmot, N.; Marsella, M.J.; *Org. Lett.* **2006**, 8, 3109. (b) Sayyed, F.B.; Suresh, C.H.; *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, 7351.

<sup>142</sup> (a) Prasad, V.; Birzin, E.T; McVaugh, C.T.; van Rijn, R.D.; Rohrer, S.P.; Chicchi, G.; Underwood, D.J.; Thornton, E.R.; Smith, A.B.; Hirschmann, R.; *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1858. (b) Moro, S.; Bacilieri, M.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5698.

## **2. Hipótesis**

En este trabajo planteamos las siguientes hipótesis:

- El agua como medio de reacción en la adición oxidativa de aminas alifáticas y aromáticas con las *p*-quinonas 2-metil-1,4-benzoquinona, 8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8*H*)-triona y el éster metílico del ácido 1,3-dimetil-5,8-dioxo-5,8-dihidro-isoquinolin-4-carboxílico, modificará tanto la reactividad como la selectividad de la reacción, con respecto al uso de diclorometano como solvente.
- Se obtendrán, mediante la metodología en agua, amino derivados de la quinona 8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8*H*)-triona con actividad como inhibidores de la enzima fosfatasa Cdc25B, que participa en el control de la proliferación celular, y con actividad antiproliferativa de células cancerosas.

## **3. Objetivos**

En los antecedentes presentados en la introducción de este trabajo hemos visto la importancia de la quinonas en general, y de las aminoquinonas en particular, con respecto a su actividad biológica. Las metodologías tradicionales para la síntesis de estos compuestos implican la adición oxidativa de la amina sobre la quinona, usando como catalizadores ácidos de Lewis. Por otro lado, aunque recientemente se han probado con éxito el uso de agua como medio de reacción para la formación de este tipo de estructuras, lo que representa una alternativa más sustentable a los medios tradicionales, no hemos encontrado estudios que comparen el uso de agua y solventes orgánicos como medios de reacción para la adición oxidativa de aminas con quinonas. De esta forma, uno de los objetivos de esta tesis se presenta a continuación:

- Estudiar y comparar la reactividad y regioselectividad de la adición oxidativa de aminas frente a quinonas en diclorometano, como modelo de medio tradicional, y en medio acuoso, como medios de química verde.

Durante los últimos años, en nuestro laboratorio se han encontrado moléculas con actividad antiproliferativa frente a células cancerosas. Una de las quinonas más activas que se ha encontrado en estos estudios es la 8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8*H*)-triona, por lo que los derivados de esta molécula que se sintetizarán en este trabajo presentan potencial interés en estas áreas. Por lo anterior, este trabajo tiene también como objetivo:

- Obtener compuestos que presenten actividad como inhibidores de la fosfatasa Cdc25B, implicada en el control del ciclo celular, y como inhibidores de la proliferación de células cancerosas.

## **4. Resultados y Discusión**

#### 4.1. Estudio de reactividad de aminas frente a quinonas

Uno de los objetivos de este trabajo fue estudiar la adición oxidativa de aminas a quinonas, modificando el medio de reacción para determinar la influencia de este en la reactividad y regioselectividad. El objetivo era comparar un medio de reacción tradicional con un medio de reacción de química verde. Por ello optamos por elegir un medio comúnmente usado en química orgánica, como es el caso del diclorometano. Este solvente presenta una constante dieléctrica de 9, lo que lo pone en un nivel intermedio de polaridad entre los solventes orgánicos, y por lo tanto es un medio adecuado para disolver buena parte de los reactivos comunes en química orgánica. Sin embargo, presenta desventajas desde el punto de vista ambiental, pues como la mayoría de los solventes organoclorados, es tóxico y requiere de tratamiento especial para su eliminación, para evitar el impacto en los ecosistemas. Como medios de reacción verde existen varias alternativas, por ejemplo líquidos iónicos,<sup>143</sup> fluidos supercríticos,<sup>144</sup> y como mencionamos en la introducción, el agua. Optamos por estudiar las reacciones en agua, debido a que es uno de los medios más accesibles y de menor costo entre los mencionados.

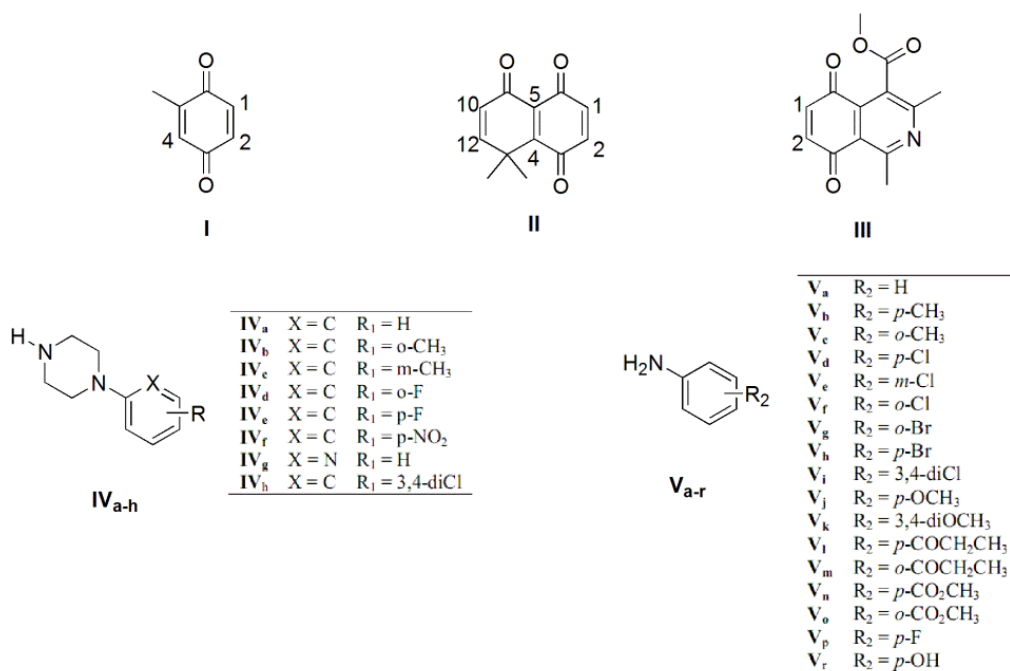
En este trabajo se estudió la reacción entre derivados de 1,4-quinonas: 2-metil-1,4-benzoquinona **I**, 8,8-dimetolnaftalen-1,4,5(8*H*)-triona **II** y el éster metílico del ácido 1,3-dimetil-5,8-dioxo-5,8-dihidro-isoquinolin-4-carboxílico **III**, (usados como quinonas modelo), con N-fenilpiperazina **IV<sub>a</sub>** and anilina **V<sub>a</sub>** (usados como aminas modelo).

---

<sup>143</sup>Seddon, K. R.; *Kinet. Catal.* **1996**, 37, 693.

<sup>144</sup>Oakes, R. S.; Clifford, A. A.; Rayner, C. M.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 917.

Además, derivados de **IV** and **V**, con distintos sustituyentes, fueron empleados para medir el alcance de la reacción.



**Figura 31. Compuestos usados en este trabajo.**

Se ha reportado recientemente, la adición de la anilina a la quinona **I**, A través de un proceso domino “*in-water*” “*on-water*” partiendo de toluhidroquinona, obteniendo solo productos de mono-adición.<sup>145</sup> Por el contrario, los productos obtenidos de la reacción de la quinona **I** y *p*-benzoquinona con una serie de anilinas, en dos trabajos previos, fueron solamente productos de bis-adición.<sup>146</sup> Por nuestra parte, llevamos a cabo la reacción de **I**

<sup>145</sup> P. Norcott, C. Spielman, C.S.P. McErlean.; *Green Chem.* **2012**, 14, 605.

<sup>146</sup> (a) Barbosa, L.C.A.; Pereira, U.A.; Maltha, C.R.A.; Teixeira, R.R.; Valente, V.N.M.; Ferreira, J.R.O.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Pessoa, C.; *Molecules* **2010**, 15, 5629. (b) Yadav, J.S.; Subba Reddy, B.V.; Swamy, T.; Shankar, K.S.; *Monatsh. Chem.* **2008**, 139, 1317.



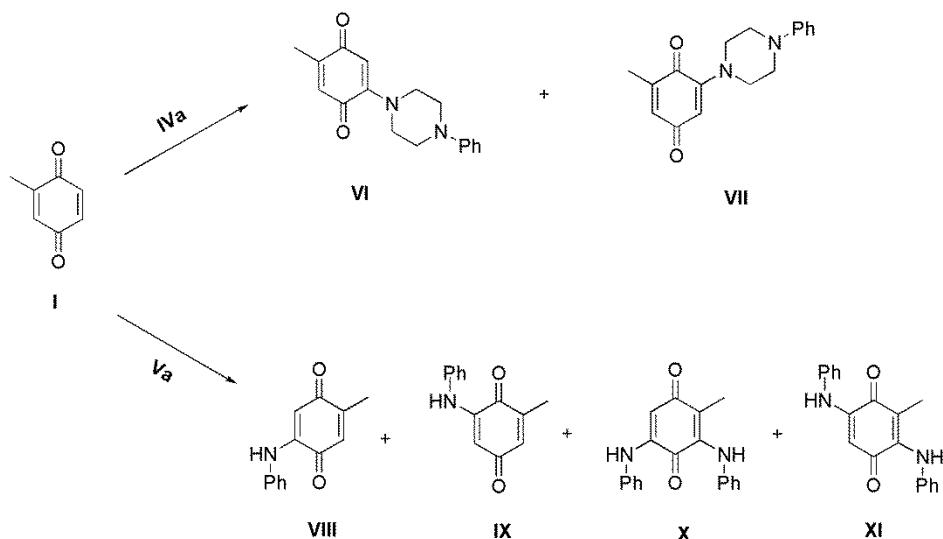
and **II** con (**V<sub>a</sub>**) y además probamos su reactividad con fenilpiperazina (**IV<sub>a</sub>**), un fragmento encontrado comúnmente en moléculas con interés biológico.<sup>147</sup>

La reacción entre **I** and **IV<sub>a</sub>** en razón equimolar y diclorometano como solvente, generó los regioisómeros **VI** and **VII** en proporción 60:40, con un 67% de rendimiento. Modificando las condiciones de reacción, usando agua como medio, los resultados variaron ligeramente, obteniéndose una proporción de **VI** and **VII** de 55:45 y un rendimiento de 66% (Tabla 1). Sorpresivamente, cuando se usó anilina como nucleófilo en diclorometano, no se observó reacción alguna, pero usando agua como medio de reacción, se obtuvieron tres productos **X**, **VIII** and **XI**, en proporción 70:20:10 respectivamente, con un 87% de rendimiento global (Tabla 2). Este rendimiento se determinó tomando en cuenta que el 50% de la quinona de partida es usada como agente oxidante de la aminohidroquinona intermediaria, para obtener a la quinona final.

Considerando un mecanismo por etapas para la formación de los productos de la bis-adición, postulamos una regioselectividad de un 90% para la primera adición.

---

<sup>147</sup>(a) Staszewski, M.; Walczynski, K.; *Med. Chem. Res.* **2013**, 22, 1287. (b) Ahmadi, A.; Khalili, M.; A. Nafarie, A.; Yazdani, A.; Nahri-Niknafs, B.; *Mini. Rev. Med. Chem.* **2012**, 12, 1282. (c) Handzlik, J.; Bajda, M.; Zygmunt, M.; Maciag, D.; Dybala, M.; Bednarski, M.; Filipek, B.; Malawska, B.; Kononowicz, K.K.; *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 2290.



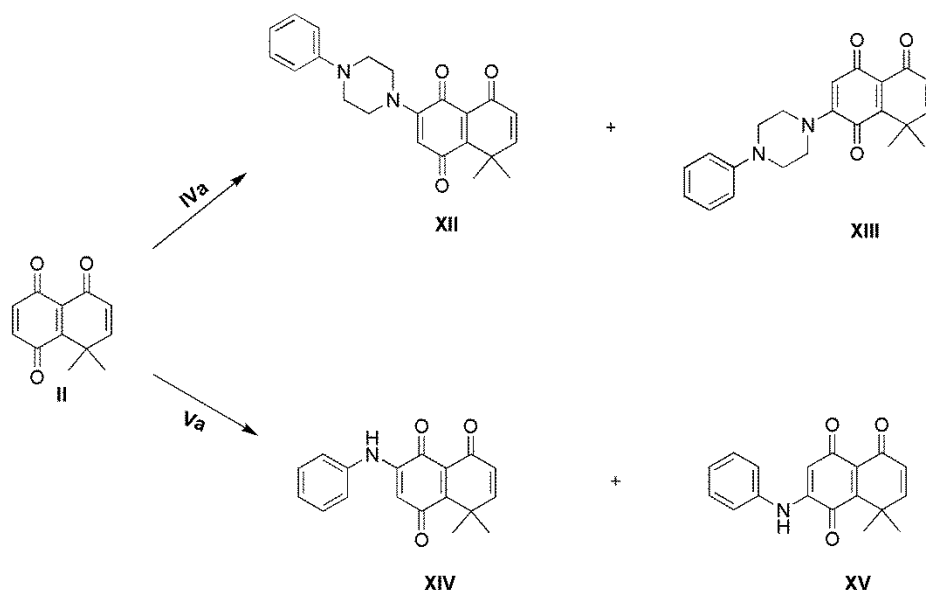
**Tabla 1. Resultados para la reacción de la quinona I y la amina IV<sub>a</sub>.**

Solvente	%VI	%VII	% Rendimiento
Diclorometano	60	40	67
Agua	55	45	66

**Tabla 2. Resultados para la reacción de la quinona I y la amina V<sub>a</sub>.**

Solvente	%VIII	%IX	%X	%XI	% Rendimiento
Diclorometano	0	0	0	0	0
Agua	20	0	70	10	87

Cuando la quinona **II**, más electrofílica, reacciona con ambas aminas, se observó un comportamiento diferente. La reacción de la quinona **II** con fenilpiperazina, en diclorometano como solvente, generó solo el regioisómero **XII**, con un 73% de rendimiento. Cuando la reacción se llevó a cabo en agua, la regioselectividad se mantuvo y el rendimiento disminuyó ligeramente (Tabla 3). Con anilina, por otra parte, se observó un comportamiento completamente distinto; usando diclorometano como solvente, se obtuvo una mezcla de los regioisómeros **XIV** y **XV**, en proporción 70:30 respectivamente, y un 40% de rendimiento (Tabla 4). Se observa entonces una disminución de la regioselectividad y la reactividad al comparar la reacción con fenilpiperazina.



**Tabla 3. Resultados para la reacción de la quinona II y la amina IV<sub>a</sub>.**

Solvente	%XII	%XIII	% Rendimiento
Diclorometano	100	0	73
Agua	100	0	70

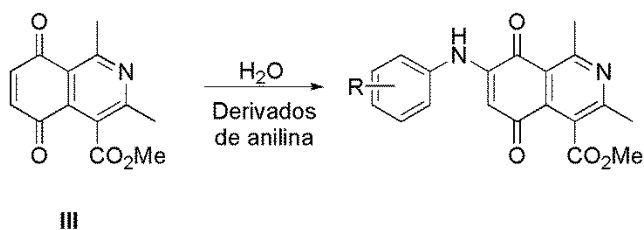
**Tabla 4. Resultados para la reacción de la quinona II y la amina V<sub>a</sub>.**

Solvente	%XIV	%XV	% Rendimiento
Diclorometano	70	30	40
Agua	100	0	88

Por otra parte, se ha descrito previamente la reacción de la quinona III con aminas aromáticas, utilizando CeCl<sub>3</sub> en etanol a temperatura ambiente, obteniendo como resultado aminoquinonas que han mostrado actividad anticáncer.<sup>148</sup> Para probar esta reacción en medio acuoso, elegimos algunas de las anilinas usadas en el trabajo reportado. Se obtuvieron productos con una regioselectividad controlada, al igual que en el trabajo descrito anteriormente (Tabla 5). Aunque los rendimientos se redujeron ligeramente, este

<sup>148</sup> Valderrama, J.A. Ibacache, J.A.; Arancibia, V.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 2894.

cambio de condiciones permite obtener los productos libres del uso catalizadores metálicos potencialmente tóxicos, como el Ce(III) y en un medio más amigable ambientalmente.



**Tabla 5. Resultados para la reacción de la quinona III con derivados de anilina.**

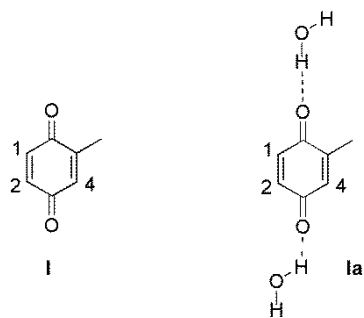
Compuesto	R	Rendimiento (%)
XVI	-H	61
XVII	- <i>p</i> -Metoxi	63
XVIII	- <i>p</i> -Fluor	54
XIX	- <i>p</i> -Hidroxi	67

#### 4.1.1. Propiedades globales y locales

Calculamos las electrofilias globales y locales de las quinonas I, II, III, IX y X, así como también la nucleofilia global de las aminas IV<sub>a</sub> y V<sub>a</sub>. Para estudiar el efecto del agua en la reactividad de estas moléculas, calculamos también sus complejos con agua.

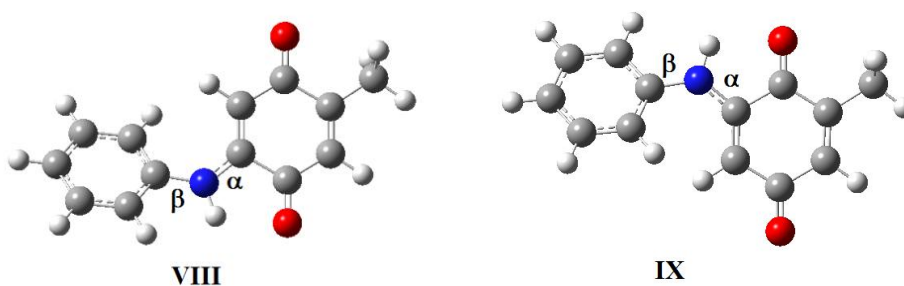
La electrofília local y global de la molécula I se presenta en la Tabla 6. Encontramos que la electrofília global de esta quinona, ( $\omega = 3.67$ ), se incrementa notablemente cuando es complejada con una molécula de agua ( $\omega = 4.36$ ), lo cual permite explicar la diferencia observada en la reacción con anilina, cuando es llevada a cabo en agua en lugar de diclorometano. En ambos casos, complejado y no complejado, la electrofília local muestra el mismo patrón, siendo C<sub>2</sub> el carbono más electrofílico ( $\omega_k = 0.40$  no solvatada, and  $\omega_k = 0.47$  solvatada) y C<sub>4</sub> el menos ( $\omega_k = 0.30$  no solvatada, and  $\omega_k = 0.32$  solvatada). Estos resultados son concordantes con la regioselectividad observada experimentalmente.

**Tabla 6. Electrofilia global y local para la quinona I y su complejo con agua Ia.**



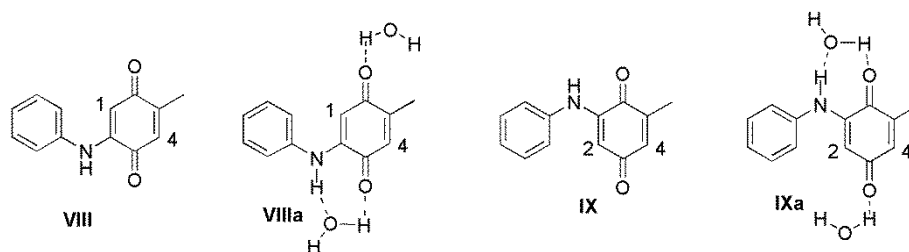
Compuestos	$\omega$	sitio	$\omega_k$
I	3.67	1	0.36
		2	0.40
		4	0.30
Ia	4.36	1	0.43
		2	0.47
		4	0.32

Dado que la reacción de la quinona **I** con anilina genera productos de bis-adición, también se calcularon las propiedades de las aminoquinonas producto de la primera adición, y sus complejos con agua. Primero, llevamos a cabo un análisis conformacional de las moléculas **VIII** y **IX**, variando los ángulos  $\alpha$  and  $\beta$ . Las conformaciones de mínima energía se presentan en la Figura 32.



**Figura 32. Geometría optimizada de los productos de la mono-adición de anilina y la quinona I.**

Se encontró que la complejación con agua también incrementa la reactividad de los productos de la mono-adición. Los valores de electrofilia local de **VIII** y **IX** (Tabla 7), muestran que  $C_4$  es mucho más reactivo que  $C_1$  y  $C_2$ , en ambas moléculas, lo que explica porque se obtuvieron solo los regiosímeros **X** y **XI**.



**Tabla 7. Resultados de las electrofilias de los productos de la mono-adición de anilina con la quinona I y sus complejos con agua.**

		VIII		VIIIa		IX		IXa	
		sitio	$\omega_k$	sitio	$\omega_k$	sitio	$\omega_k$	sitio	$\omega_k$
$\omega$	3.52	1	0.14	$\omega$ 4.07	1	0.12	$\omega$ 3.61	2	0.17
		4	0.23		4	0.23		4	0.50
								2	0.15
								4	0.60

Por otra parte, para la interacción de la quinona II con moléculas de agua, se consideraron dos modos de coordinación. El primero con dos moléculas de agua, una de ellas coordinando con los oxígenos carbonílicos 1 y 2, y la otra con el oxígeno carbonílico 3 (modo **a**). El segundo modo consideró la coordinación con tres moléculas de agua, una con cada oxígeno carbonílico (modo **b**). Dependiendo del modo de coordinación, la electrofilia global (Tabla 8) muestra un comportamiento distinto. La quinona no solvatada presenta un valor de electrofilia global de 4.43. La electrofilia local (Tabla 8) muestra que  $C_1$  ( $\omega_k = 0.45$ ) es más reactiva que  $C_2$  ( $\omega_k = 0.30$ ), lo que concuerda con la regioselectividad experimental observada en diclorometano.  $C_4$  y  $C_5$  también tienen un valor de electrofilia local elevado, sin embargo se ha propuesto que el *gem*-dimetilo genera un impedimento estérico que bloquea la reactividad de estos carbonos, por ejemplo en reacciones Diels-Alder. Esto concuerda con lo observado en este caso.<sup>149</sup>

<sup>149</sup> Valderrama, J.A.; Araya-Maturana, R.; Zuloaga, F.J.; *Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1103.

En el modo **a**, la electrofilia global de la quinona complejada se redujo ligeramente de 4.43 a 4.33, y la diferencia de electrofilias locales entre C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> se incrementa (0.44 vs 0.22) comparada con el caso no complejado (0.45 vs 0.30). En el modo **b**, la electrofilia global se incrementa al complejar con agua, desde 4.43 a 4.87, y la diferencia de electrofilia local entre C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> se mantiene (0.51 vs 0.36). Los resultados del modo **a** concuerdan con el incremento de la regioselectividad observado, cuando la reacción con anilina se lleva a cabo en agua en lugar de diclorometano. Por otra parte, la electrofilia global en el modo **b** predice correctamente el incremento en la reactividad de la reacción llevada a cabo en agua. La energía de los modos **a** y **b** son muy similares ( $\Delta E = 0.12$  kcal/mol), por lo que ambos contribuyen para explicar el aumento en la reactividad y regioselectividad observada en esta reacción.

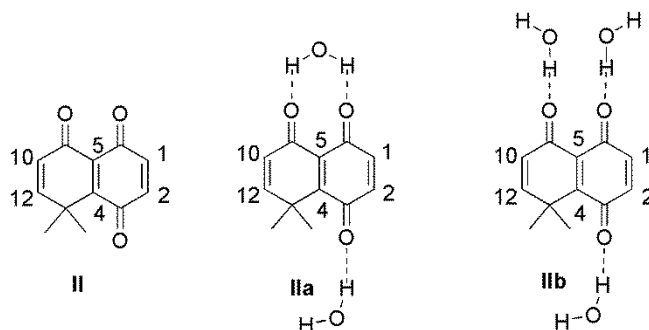


Tabla 8. Electrofilias de la quinona **II** y sus complejos con agua.

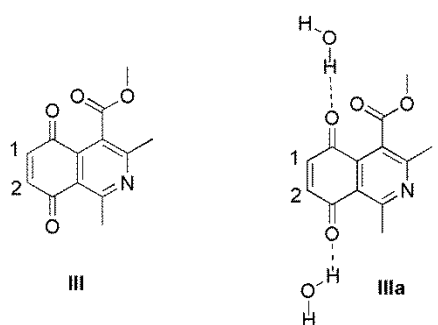
<b>II</b>		<b>IIa</b>		<b>IIb</b>				
	Sitio	$\omega_k$		Sitio	$\omega_k$			
$\omega$	1	0.45	$\omega$	1	0.44	$\omega$	1	0.51
	2	0.30		2	0.22		2	0.36
	4	0.49		4	0.46		4	0.47
	5	0.44		5	0.48		5	0.46
	10	0.01		10	0.01		10	0.02
	12	0.02		12	0.03		12	0.02
	4.43		4.33		4.87			

Los índices de reactividad para la isoquinolinquinona **III** y el complejo con dos moléculas de agua fueron también calculados. Encontramos que la complejación con agua aumenta la

electrofilia global (Tabla 9) de 3.78 a 4.33, mientras que la diferencia de electrofilia local entre C<sub>8</sub> y C<sub>10</sub> también se incrementa, aunque en menor medida. Estos resultados son coherentes con los resultados experimentales, donde se encontró que el efecto del agua como medio reacción, sin catalizador, era prácticamente equivalente al uso de sales de Ce(III) como catalizador en etanol, previamente reportado.<sup>27</sup>

**Tabla 9. Electrofilia global y local de la quinona III y su complejo con agua.**

Compuesto	$\omega$	Sitio (k)	$\omega_k$
<b>III</b>	3.78	1	0.37
		2	0.48
<b>IIIa</b>	4.33	1	0.40
		2	0.52



Para estudiar también el efecto del agua en los nucleófilos, calculamos la nucleofilia global de las aminas **IV<sub>a</sub>** y **V<sub>a</sub>**, a través de los métodos 1 al 4 mencionados en la metodología teórica.

Los resultados se muestran en la Tabla 10. Podemos ver que solo el método 2 reproduce correctamente el incremento de la reactividad de la anilina **IV<sub>a</sub>** cuando es solvatada; además reproduce correctamente la mayor nucleofilia de la fenilpiperazina **V<sub>a</sub>** comparada con la anilina, cuando se encuentran sin complejar, lo cual es coherente con los resultados experimentales en diclorometano.

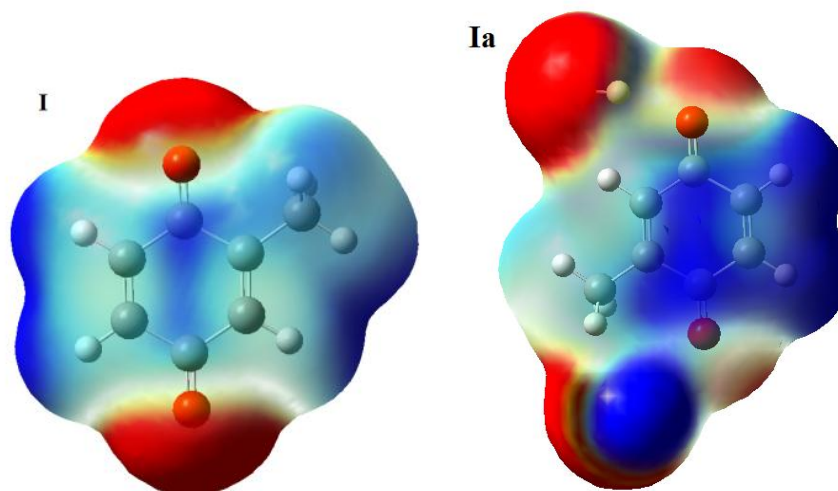
**Tabla 10. Nucleofilia de las aminas **IV<sub>a</sub>**, **V<sub>a</sub>** y sus complejos con agua.**

Método	<b>IV<sub>a</sub></b>	<b>IV<sub>a1</sub></b>	<b>V<sub>a</sub></b>	<b>V<sub>a1</sub></b>
1	3.73	3.18	3.90	3.78
2	1.74	1.27	1.43	1.61
3	3.56	3.44	3.68	3.65
4	3.07	3.10	3.15	3.20



#### 4.1.2. Potencial Electrostático Molecular

Para generar el MEP, los valores codificados fueron proyectados en una superficie de energía iso-potencial de 0.02 a.u. El color rojo indica los sitios negativos de la molécula, mostrando sitios factibles para un ataque electrofílico, mientras el color azul indica sitios positivos, potencialmente factibles para un ataque nucleofílico. Calculamos el MEP para las quinonas **I**, **II**, **III**, **VIII**, **IX** y sus complejos con agua (Figura 33). Como se esperaba, la quinona **II** muestra dos sitios ricos en electrones situados en los oxígenos, y tres sitios deficientes de electrones ubicados en los carbonos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>4</sub>. El MEP del complejo **IIa** muestra que C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> incrementan su carácter deficiente de electrones, a diferencia de C<sub>4</sub> donde prácticamente desaparece. El MEP de las aminoquinonas **IX** y **X**, y sus complejos con agua muestran que C<sub>4</sub> es más electro-deficiente que C<sub>1</sub>, lo que concuerda con las electrofilias locales que se habían calculado, así como también con los resultados experimentales.



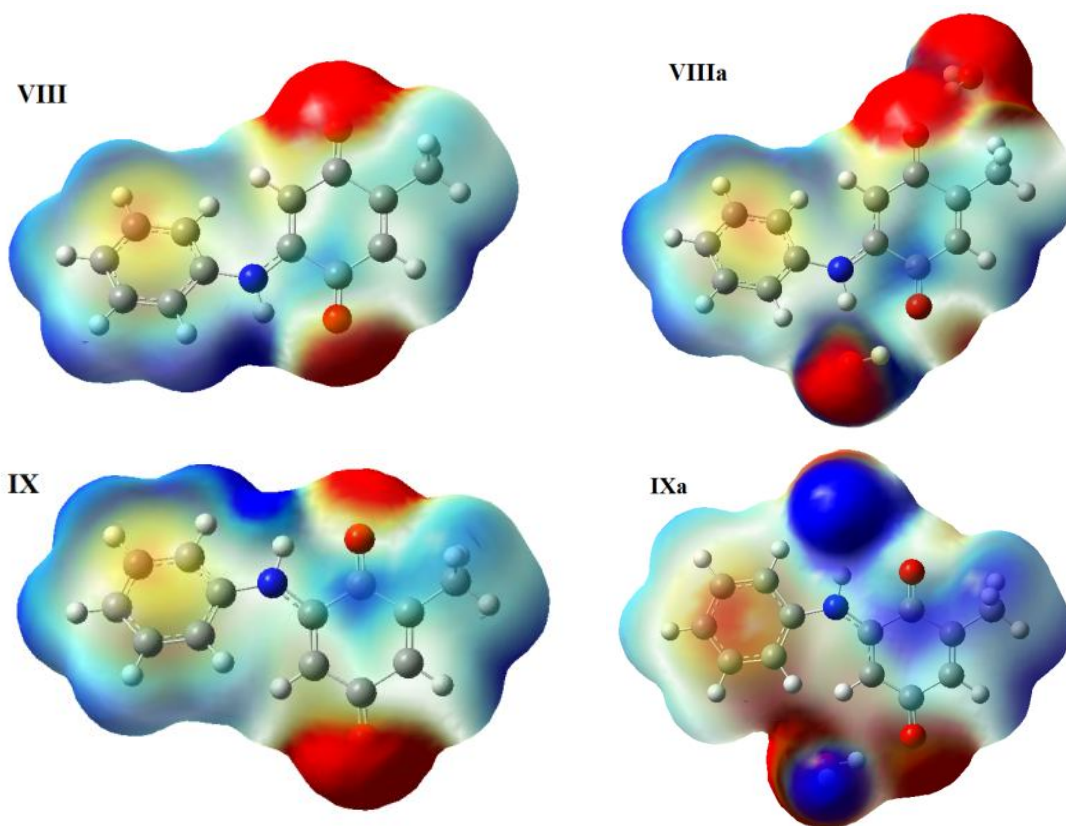


Figura 33. MEP de la quinona **I**, los productos de la mono-adición con aniline y sus complejos con agua.

Por otra parte, el MEP de la quinona **II** (Figura 34) muestra tres sitios con alta densidad electrónica, ubicados en los oxígenos carbonílicos. Los oxígenos vecinos, de los carbonilos en posición 1,3, generan una región fuertemente electro-negativa alrededor de ellos. En cambio, el oxígeno carbonílico vecino (posición 1,3) al grupo *gem*-dimetilo, exhibe una electronegatividad menor. Además, esta zona electronegativa se ve distorsionada por el efecto estérico del *gem*-dimetilo. Esta molécula también presenta sitios electro-deficientes en C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>. El complejo **II**<sub>a</sub> muestra que la complejación de una molécula de agua con el oxígeno del carbonilo ubicado entre C<sub>2</sub> y C<sub>4</sub>, bloquea con su densidad electrónica a C<sub>2</sub>. Este impedimento estereoelectrónico, junto con la variación de la electrofilia local en C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>,

ayudan a explicar el incremento de la regioselectividad de la reacción con anilina. El complejo **II<sub>b</sub>**, muestra una distribución de la densidad electrónica similar a **II**.

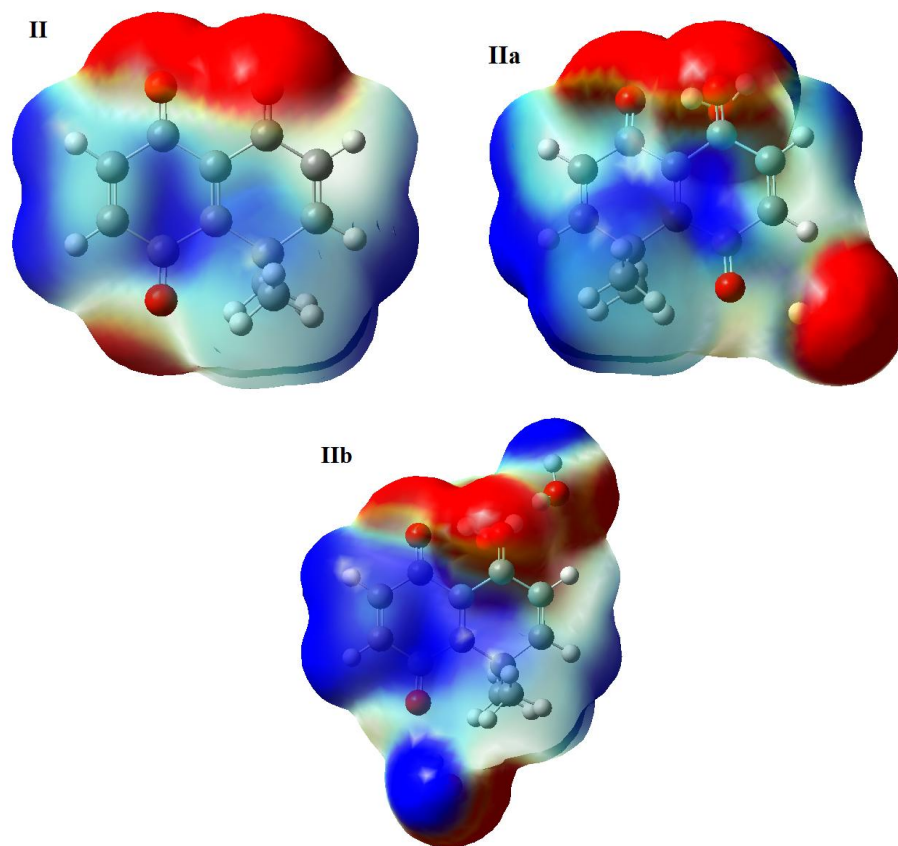


Figura 34. MEP de la quinona **II** y sus complejos con agua.

La isoquinolinquinona **III** muestra en el mapa de su MEP (Figura 35), una alta densidad electrónica sobre los oxígenos carbonílicos y el nitrógeno del anillo aromático, mientras que los carbonos carbonílico,  $C_1$  y  $C_2$ , muestran sus zonas electro-deficientes. El complejo con agua **III<sub>a</sub>**, muestra un incremento del carácter electro-deficiente en  $C_1$ , mientras que  $C_2$  se ve impedido estéricamente, a causa de la densidad electrónica la molécula de agua coordinada con el oxígeno carbonílico vecino. Estos resultados muestran que, al igual que la variación de la reactividad local, los efectos estereo-electrónicos también están implicados en la alta regioselectividad de la reacción en agua.

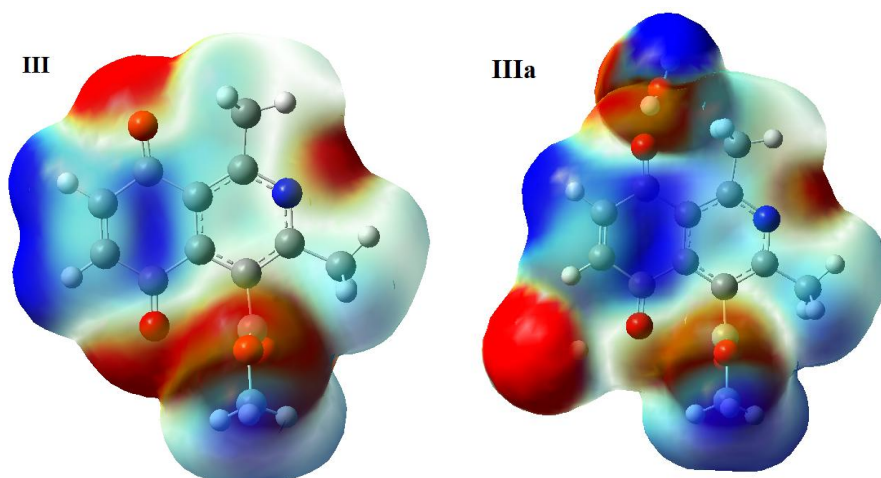
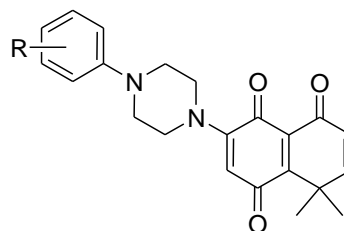
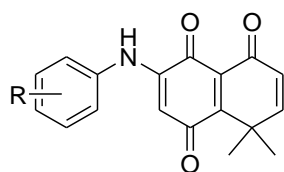


Figura 35. MEP de la quinona III y sus complejo con agua.

#### 4.1.3. Uso de la metodología en agua para obtención de derivados de aminoquinonas

La quinona II ha sido usada para obtener compuestos con actividad antiproliferativa de células cancerosas.<sup>57</sup> Basados en los resultados anteriores, utilizamos la metodología en agua para obtener anilín y *N*-fenilpiperzínil derivados (Tabla 11). Sustituyentes de distinta naturaleza en el anillo aromático, tanto en los derivados de anilina como de fenilpiperazina, mostraron no afectar mayormente las posibilidades de la reacción.

Los resultados muestran que la reacción en agua tolera sustituyentes de distinta naturaleza en el anillo de la anilina. Los mejores rendimientos fueron obtenidos con los sustituyentes electro-dadores más fuertes, los cuales son capaces de incrementar la nucleofilia del nitrógeno de la amina. Sin embargo, con sustituyentes electro-atradores también se obtienen los productos correspondientes, aunque en el caso de los atradores más fuerte, disminuye el rendimiento.



**Tabla 11. Rendimiento de la síntesis de derivados de aminoquinonas sustituidas de la quinona II, obtenidas en agua.**

Compuesto	R <sub>1</sub>	Rendimiento (%)	Compuesto	X	R <sub>2</sub>	Rendimiento (%)
<b>XX<sub>a</sub></b>	<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	68	<b>XXI<sub>a</sub></b>	C	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	68
<b>XX<sub>b</sub></b>	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	81	<b>XXI<sub>b</sub></b>	C	<i>m</i> -OCH <sub>3</sub>	81
<b>XX<sub>c</sub></b>	<i>p</i> -Cl	65	<b>XXI<sub>c</sub></b>	C	<i>o</i> -F	65
<b>XX<sub>d</sub></b>	<i>m</i> -Cl	57	<b>XXI<sub>d</sub></b>	C	<i>p</i> -F	57
<b>XX<sub>e</sub></b>	<i>o</i> -Cl	51	<b>XXI<sub>e</sub></b>	C	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	36
<b>XX<sub>f</sub></b>	<i>o</i> -Br	47	<b>XXI<sub>f</sub></b>	N	H	59
<b>XX<sub>g</sub></b>	<i>p</i> -Br	57	<b>XXI<sub>g</sub></b>	C	3,4-diCl	57
<b>XX<sub>h</sub></b>	3,4-diCl	74				
<b>XX<sub>i</sub></b>	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	92				
<b>XX<sub>j</sub></b>	3,4-diOCH <sub>3</sub>	95				
<b>XX<sub>k</sub></b>	<i>p</i> -COCH <sub>3</sub>	41				
<b>XX<sub>l</sub></b>	<i>o</i> -COCH <sub>3</sub>	36				
<b>XX<sub>m</sub></b>	<i>p</i> -CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	59				
<b>XX<sub>n</sub></b>	<i>o</i> -CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	57				

En el caso de las *N*-fenilpiperazinas, los sustituyentes en el anillo aromático no afectan directamente la nucleofilia del nitrógeno, pero también pueden tener una influencia, por ejemplo, modificando la hidrofobia de la molécula, lo cual puede explicar las variaciones en el rendimiento de estos productos.

## 4.2. Actividad biológica de las aminoquinonas

### 4.2.1. Inhibidores de la enzima fosfatasa Cdc25B

Como (se indicó) en la introducción, entre los inhibidores más potentes de la enzima Cdc25B se encuentran algunos compuestos con un núcleo *p*-quinónico (Figura 36). Entre ellos se ha descrito la quinona NSC-95397, la cual es capaz de bloquear la transición G2/M.<sup>150</sup> La tioquinona Cpd 5 inhibe la Cdc25B en las células Hep3B, con una  $K_i$  de 1,7  $\mu\text{M}$ .<sup>151</sup>

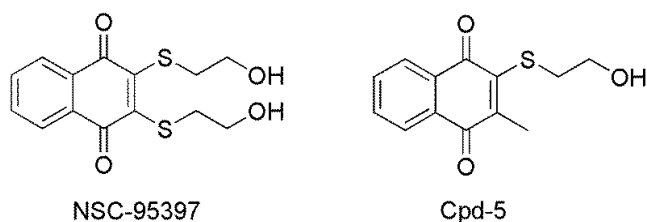


Figura 36. Inhibidores de la enzima Cdc2B NSC-95397 y Cpd-5.

A través de screening virtual de la base de datos ZINC, que tiene alrededor de 10 millones de compuestos, usando cálculos de docking. Se observó que una característica común de un conjunto numeroso de inhibidores que exhiben altas afinidades, es una estructura del tipo que se muestra en la Figura 37.

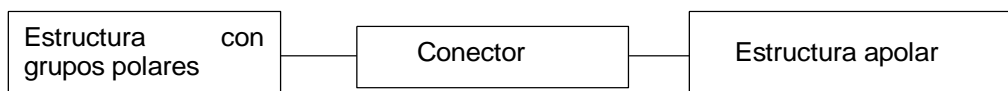


Figura 37. Estructura hipotética para potenciales inhibidores de la enzima Cdc25B

<sup>150</sup> Lazo, J. S.; Nemoto, K.; Pestell, K. E.; Cooley, K.; Southwick, E. C.; Mitchell, D. A.; Furey, W.; Gussio, R.; Zaharevitz, D. W.; Joo, B.; Wipf, P.; *Mol. Pharmacol.* **2002**, 61, 720.

<sup>151</sup> Tamura, K.; Southwick, E.C.; Kerns, J.; Rosi, K.; Carr, B. I.; Wilcox, C.; Lazo, J.S.; *Cancer Res.* **2000**, 60, 1317.

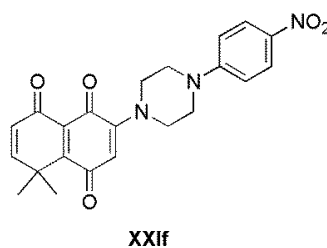
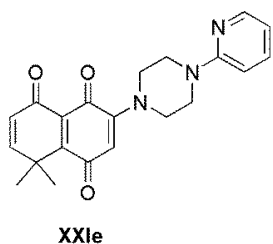
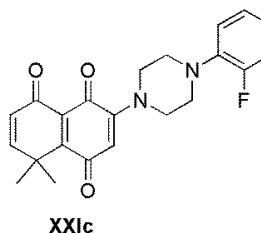
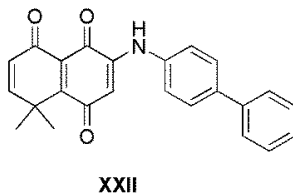
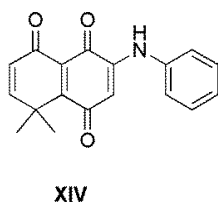
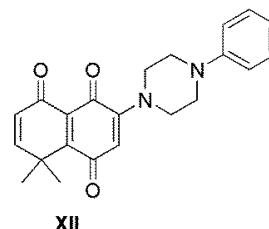
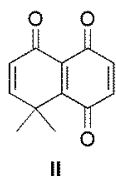
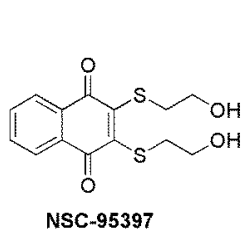
En base a lo anterior, pensamos que una quinona puede actuar perfectamente como la parte polar. Además, una estructura con dos grupos cercanos aceptores de enlaces de hidrógeno, puede funcionar como análogo al grupo fosfato (estructura importante en los sustratos de la enzima Cdc25B),<sup>152</sup> la quinona **II** cumple con estas características. Los compuestos sintetizados, presentan una estructura donde el nitrógeno funciona como conector del anillo aromático, mientras que en las fenilpiperazinilquinonas presentan una estructura donde el conector es el anillo de piperazina. Se realizó el estudio cinético enzimático de la anilinquinona **XIV** y de la fenilpiperazinilquinona **XII**, además de los derivados **XXI<sub>c</sub>**, **XXI<sub>e</sub>**, **XXI<sub>f</sub>** (Tabla 12). También, se realizó un screening virtual, tomando como base la quinona **II** y una gran variedad de aminas comerciales, que se pueden unir a través de la reacción de adición oxidativa descrita previamente. A través de esta búsqueda llegamos al compuesto **XXII**, que presenta un anillo aromático a mayor distancia que los compuestos anteriores. Además de los compuestos **XXI<sub>c</sub>**, **XXI<sub>e</sub>**, **XXI<sub>f</sub>** y **XXII** también se estudió la quinona **II** sin sustituyentes y la quinona **NSC95397**, como referencia.

Los resultados muestran (Tabla 12) al inhibidor comercial **NSC95397** con la menor  $K_i$ , con un valor de 0,56  $\mu\text{M}$ , y un tipo de inhibición no competitiva (el compuesto se une al complejo enzima sustrato y no a la enzima libre). Las quinonas sintetizadas presentan en todos los casos inhibición mixta, es decir se unen tanto a la enzima libre ( $K_i$ ) como al complejo enzima sustrato ( $K_i'$ ). La quinona **II** exhibe la menor capacidad de inhibición competitiva (mayor  $K_i$ ), comparado con sus derivados que presentan un conector amino unido a diferentes estructuras aromáticas. Sin embargo, presenta una  $K_i'$  menor ( $7,975 \pm 0,859$ ) lo que indica una mayor afinidad por el complejo enzima sustrato que por la enzima libre. Las aminoquinonas presentan valores de  $K_i$  y  $K_i'$  similares, lo que indica una

---

<sup>152</sup> Rudolph, J.; *Biochemistry* **2007**, 46, 3594.

afinidad similar para unirse a la enzima libre y al complejo enzima sustrato, salvo en el caso del compuesto **XXI<sub>f</sub>**, con un grupo nitro en el anillo aromático del fragmento fenilpiperazínico, el cual exhibe una afinidad mayor por el complejo enzima sustrato ( $K_i' = 0,562 \pm 0,089 \mu\text{M}$ ) que por la enzima libre ( $K_i = 3,231 \pm 0,572 \mu\text{M}$ ). Dado que el sitio catalítico de la enzima se encuentra ocupado por el sustrato, la unión de los compuestos con el complejo enzima sustrato debe ocurrir en un sitio distinto al sitio catalítico, conocido comúnmente como sitio alostérico. Es posible suponer, dada la similitud estructural de las aminoquinonas, que la presencia del grupo nitro es un factor importante en la afinidad por el sitio alostérico, donde se están uniendo los compuestos al complejo enzima sustrato.





**Tabla 12. Efecto de las quinonas sobre la inhibición enzimática de la enzima Cdc25B.**

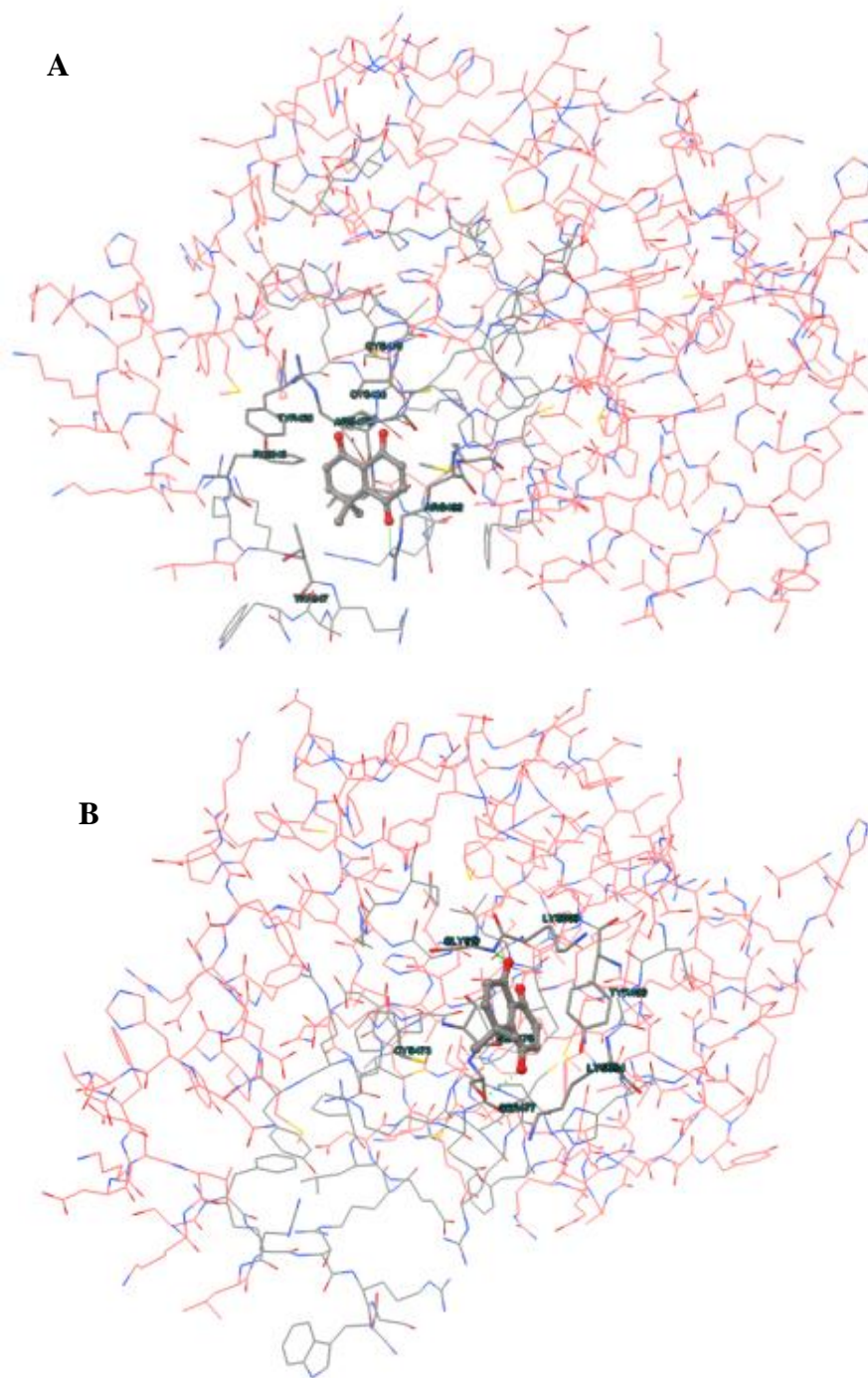
<b>Compuesto</b>	<b>Ki (μM)</b>	<b>Ki' (μM)</b>	<b>Tipo de inhibición</b>
<b>NSC-95397</b>	0,56 ± 0,05	-	No competitiva
<b>II</b>	41,92 ± 4,69	7,98 ± 0,86	Inhibición mixta
<b>XII</b>	6,15 ± 0,66	1,92 ± 0,36	Inhibición mixta
<b>XIV</b>	15,97 ± 1,62	9,25 ± 0,22	Inhibición mixta
<b>XXIc</b>	7,02 ± 0,66	3,24 ± 1,56	Inhibición mixta
<b>XXIe</b>	16,47 ± 1,75	15,22 ± 2,11	Inhibición mixta
<b>XXIf</b>	3,23 ± 0,57	0,56 ± 0,09	Inhibición mixta
<b>XXII</b>	3,28 ± 0,26	2,78 ± 0,14	Inhibición mixta

#### **4.2.2. Cálculos de docking molecular**

Los cálculos de docking fueron llevados a cabo para determinar la orientación preferencial que adoptan los inhibidores en el sitio activo de la enzima. Debido a que experimentalmente encontramos que la quinona **II** y sus derivados estudiados presentan inhibición mixta, es posible pensar que la unión con la enzima libre se produzca en el sitio activo, explicando en parte la acción inhibitoria.

La postura más representativa de los compuestos en el sitio activo de la enzima Cdc25B, fue seleccionada considerando tanto la energía de interacción enzima-inhibidor como el número de conformaciones en cada familia o cluster.

La quinona **II** presentó dos familias con un número cercano de conformaciones en ella, A con 34 y B con 29 (de un total de 100 evaluaciones), además de una energía de interacción cercana (6,38 Kcal/mol para A y 5,09 Kcal/mol para B). La Figura 38 muestra las conformaciones de menor energía para la familia A y B, el sitio de unión en A corresponde al sitio catalítico, mientras que B corresponde a un segundo sitio de unión distinto.



**Figura 38. Ilustración con las dos mejores conformaciones (A y B) del compuesto II en el sitio catalítico y en un segundo sitio de la Cdc25B.**

La Figura 39 muestra las interacciones específicas para las conformaciones de menor energía de A y B, en el caso de A se observa un enlace de hidrógeno entre la arginina 483 y

un carbonilo de la quinona **II**, mientras que para B se observan dos enlaces de hidrógeno, uno de dos centros entre el ácido glutámico 478 y uno de los carbonilos de la quinona, y uno de tres centros entre los dos carbonilos en posición 1,3 en la quinona y una amina de una cadena lateral de la lisina 509.

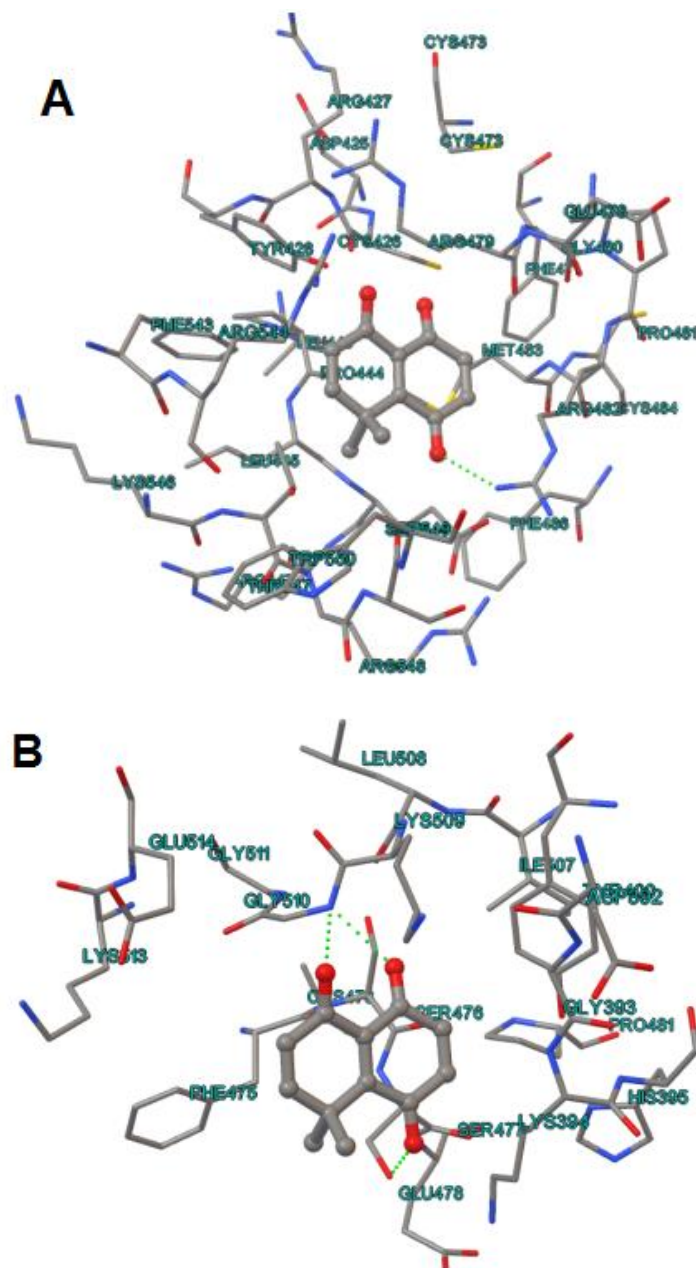
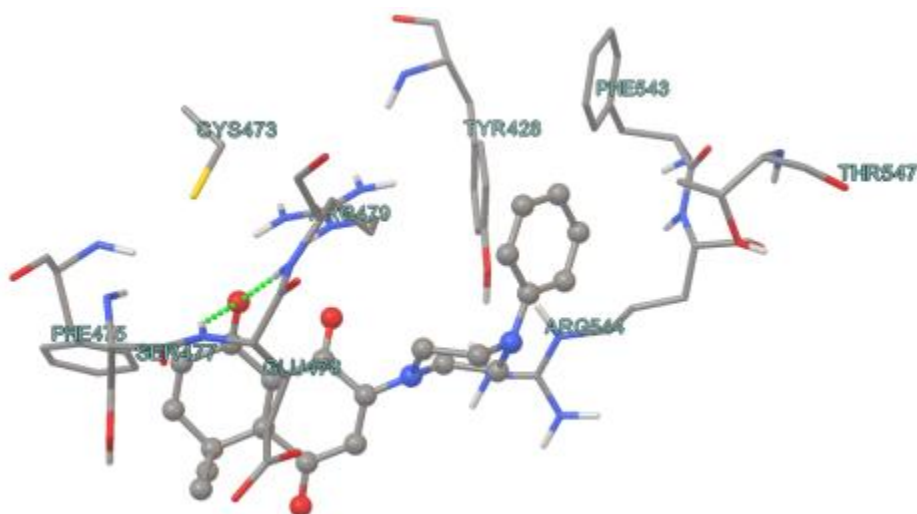


Figura 39. Interacciones del compuesto II en el sitio catalítico de la enzima (A) y en un segundo sitio de unión (B)

En el caso de las aminoquinonas, se estudió la fenilpiperazinilquinona **XII** y su derivado fluorado **XXI<sub>c</sub>**. En estos casos, encontramos que presentan una familia con un número elevado de conformaciones en ella y con la menor energía de interacción. Ambas moléculas se ubican de manera similar, en su conformación de mínima energía, en el sitio catalítico de la fosfatasa. La Figura 40 muestra la conformación de mínima energía para la quinona **XII**, donde se observa un enlace de hidrógeno de tres centros, entre un carbonilo quinónico y aminas de cadenas laterales del ácido glutámico 478 y la serina 477. El fragmento de fenilpiperzina se ubica en un bolsillo lateral cercano al sitio catalítico.



**Figura 40. Modo de unión de las quinona XII en el sitio activo de la enzima Cdc25B.**

Estos resultados nos muestran que la quinona **II**, sin sustituyentes, presenta una unión más débil con el sitio catalítico, comparada con las aminoquinonas, lo que concuerda con la  $K_i$  menor que presenta la quinona **II** comparada con las aminoquinonas.

### 4.2.3. Inhibidores de la respiración mitocondrial

Además de estudiar la acción sobre la enzima Cdc25B, se estudió el efecto de algunos de nuestros compuestos sintetizados y del compuestos **NSC95397**, sobre la respiración (consumo de oxígeno) de mitocondrias aislada de células TA3 (carcinoma mamario de ratón), ya que se ha encontrado que la hidroquinona de la cual proviene la quinona **II** presentaba actividad antiproliferativa de células cancerosas, asociada a la inhibición de la respiración mitocondrial.<sup>57</sup>

El efecto de los compuestos sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13. Efecto de las quinonas sobre la respiración mitocondrial de mitocondrias aisladas de células TA3.**

<b>Compuesto</b>	<b>IC<sub>50</sub>(<math>\mu</math>M)</b>
<b>NSC-95397</b>	17,90 $\pm$ 1,270
<b>II</b>	17,72 $\pm$ 1,070
<b>XII</b>	>100
<b>XIV</b>	>100
<b>XXII</b>	>100

En el caso de la respiración mitocondrial, vemos que las aminoquinonas resultaron inactivas ( $IC_{50} > 100$ ), mientras que las quinonas **II** y **NSC95397** presentan inhibición de la respiración mitocondrial con un  $IC_{50}$  cercano a 18  $\mu$ m. Podemos establecer entonces que la adición de un sustituyente amino, ya sea anilina, fenilpiperzina o bisfenilamina en la quinona **II** inactiva su acción en la mitocondria.

#### 4.2.4. Efecto de los compuestos sobre la proliferación celular

Se estudió el efecto de las aminoquinonas, la quinona **II** y la quinona **NSC95397** sobre la proliferación de células de cáncer de mama de ratón (TA3), células de cáncer de mama humanas (MCF7), células normales de mama de ratón (MM3MG) y células normales de mama humanas (HME1), los resultados se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14. IC<sub>50</sub> de algunas anilin-quinonas, la quinona **II** y la quinona **NSC95397** sobre la proliferación celular de células mamarias de ratón TA3 (cáncer), MM3MG (no malignas) y células mamarias humanas MCF7 (cáncer) y HME1 (no malignas).**

Compuesto	R	TA3 (μM)	MM3MG (μM)	MCF7 (μM)	HME1 (μM)
<b>NSC 95397</b>	-	3,03	-	12,19	0,67
<b>II</b>	-	13,03	16,41	91,99	5,34
<b>XX<sub>b</sub></b>	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	26,24	37,16	23,26	4,09
<b>XX<sub>c</sub></b>	<i>p</i> -Cl	25,35	15,86	>100	21,46
<b>XX<sub>d</sub></b>	<i>m</i> -Cl	11,92	11,37	62,11	4,33
<b>XX<sub>e</sub></b>	<i>o</i> -Cl	19,27	51,72	18,67	1,94
<b>XX<sub>g</sub></b>	3,4-diCl	34,73	97,55	58,63	7,45
<b>XX<sub>i</sub></b>	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	19,28	80,92	26,28	4,98
<b>XX<sub>k</sub></b>	<i>p</i> -COCH <sub>3</sub>	15,57	12,71	>100	21,46
<b>XX<sub>l</sub></b>	<i>o</i> -COCH <sub>3</sub>	1,29	2,52	>100	3,69
<b>XX<sub>m</sub></b>	<i>p</i> -CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	36,19	22,92	>100	25,25
<b>XX<sub>n</sub></b>	<i>o</i> -CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	25,03	42,04	26,94	1,19

Frente a las células TA3, todos los compuestos presentan una actividad en el rango micromolar, frente a las células normales también presentan actividad en rango micromolar. Las células de cáncer de ratón presentan en todos los casos una mayor susceptibilidad que las células normales de ratón, dando siempre una relación células tumorales/células normales (índice de selectividad) mayor a 1. En el caso de las células de cáncer humano MCF7, los compuestos resultaron menos activos que frente a las células normales, estando la aminoquinona **XXI<sub>a</sub>** fuera del rango micromolar. En el caso de las células normales humanas HME1, se observa que son más susceptibles que las células de cáncer, dando siempre una relación células tumorales/células normales (índice de

selectividad) menor a 1. Los compuestos más activos frente a las células tumorales de ratón TA3 fueron la *o*-acetil aminoquinona **XX<sub>1</sub>** (1,29  $\mu$ M) y la quinona **NSC95397** (3,03  $\mu$ M), mientras que frente a las células tumorales humanas MCF7 los compuestos más activos fueron la quinona **NSC9397** (12,19  $\mu$ M) y la *o*-cloro aminoquinona **XX<sub>e</sub>** (18,67  $\mu$ M).

Las fenilpiperazinilquinonas fueron probadas también frente a las líneas celulares de cáncer mamario de ratón TA3 y normales de mama de ratón MM3MG. Frente a las TA3, todos los compuestos presentaron efecto antiproliferativo en el rango micromolar, al igual que frente a las MM3MG. Las células de cáncer TA3 fueron en todos los casos más susceptibles a las fenilpiperazin quinonas que las células normales MM3MG, dando siempre una relación células tumorales/células normales (índice de selectividad) menor a 1.

**Tabla 15. IC<sub>50</sub> de algunas fenilpiperzin-quinonas sobre la proliferación celular de células mamarias de ratón TA3 (cáncer) y MM3MG (no malignas).**

Compuestos	X	R	TA3 ( $\mu$ M)	MM3MG ( $\mu$ M)
<b>XII</b>	C	H	16,90	35,00
<b>XXI<sub>a</sub></b>	C	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	10,07	55,09
<b>XXI<sub>b</sub></b>	C	<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	5,16	29,18
<b>XXI<sub>c</sub></b>	C	<i>o</i> -F	16,48	29,73
<b>XXI<sub>d</sub></b>	C	<i>p</i> -F	9,73	30,28
<b>XXI<sub>e</sub></b>	C	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	35,14	60,72
<b>XXI<sub>f</sub></b>	N	-H	17,27	>100

El compuesto más activo de esta serie fue la *m*-metilfenilpiperzin quinona **XXI<sub>b</sub>**, con un IC<sub>50</sub> de 5,16  $\mu$ M.

Los estudios de inhibición de la enzima Cdc25B fueron llevados a cabo en laboratorio del profesor Dante Miranda, en la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, mientras que los estudios de respiración mitocondrial y proliferación celular fueron llevados a cabo en el laboratorio del profesor Jorge Ferreira, en la facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

## **5. CONCLUSIONES**



En resumen, se encontró que el medio acuoso incrementa tanto la reactividad como la regioselectividad, en las reacciones de acoplamiento C-N de aminas con quinonas. Para los casos estudiados en este trabajo, las reacciones en agua dan mejores, o al menos, los mismos resultados que al usar un medio de reacción convencional como diclorometano. Los índices de electrofilia calculados para las quinonas concuerdan con la reactividad experimental. Entre las nucleofilias calculadas, usando cuatro métodos descritos recientemente, solo una fue concordante con la nucleofilia experimental de las aminas. El MEP de las quinonas permitió visualizar cambios en la densidad electrónica generada por la solvatación con agua, lo cual ayudó a explicar los cambios de reactividad, reforzando las explicaciones basadas en los índices de reactividad. El MEP también mostró que el efecto estéreo-electrónico de los grupos carbonilos, es también un factor importante para explicar algunos de los resultados.

Gracias a la metodología antes descrita y un screening virtual, utilizando docking, se logró obtener nuevos inhibidores de la enzima fosfatasa Cdc25B, basados en una estructura quinónica. Se encontró que la quinona **II** muestra un incremento en su actividad inhibitoria, al adicionarle un sustituyente amino. Si bien ninguno de los compuestos resultó mejor que el inhibidor comercial NSC95397, dos de ellos presentan una actividad comparable, los compuestos **XXI<sub>f</sub>** y **XXII** con una  $K_i$  de 3,23 y 3,28  $\mu\text{M}$  respectivamente, además **XXI<sub>f</sub>** presenta una  $K_i'$  de 0,56  $\mu\text{M}$ . Los cálculos de docking muestran que la quinona **II** sin sustituyentes presenta una unión más débil con el sitio catalítico, comparada con las aminoquinonas, lo que concuerda con la  $K_i$  menor que presenta la quinona **II** comparada con las aminoquinonas.

Los compuestos obtenidos en este trabajo fueron estudiados como agentes antiproliferativos de células cancerosas de mama de ratón (TA3) y humanas (MCF7), además de estudiarse su selectividad probando también su efecto sobre la proliferación de las correspondientes células normales (MM3MG y HME1). También se estudiaron algunos de ellos como inhibidores de la respiración de mitocondrias aisladas de células TA3. Los resultados de inhibición de la respiración mitocondrial mostraron que las aminoquinonas (**XII**, **XIV** y **XXII**) son inactivas ( $IC_{50} > 100$ ), mientras que las quinonas **II** y **NSC95397** presentaron inhibición de la respiración mitocondrial con un  $IC_{50}$  cercano a 18  $\mu$ M. Se puede concluir entonces que la adición de un sustituyente amino, ya sea anilina, fenilpiperazina o bisfenilamina en la quinona **II** impide su acción en la respiración mitocondrial. Los resultados de inhibición de la proliferación celular, mostraron que para el caso de las células de ratón la relación de proliferación de células cancerosas/células normales siempre es mayor a uno, indicando una selectividad por las células cancerosas, en cambio en las células humanas esta relación se invierte, siendo siempre las células normales HME1 más susceptibles que las cancerosas. Los compuestos más activos frente a las células tumorales de ratón TA3 fueron la *o*-acetil aminoquinona **XX<sub>I</sub>** (1,29  $\mu$ M) y la quinona comercial **NSC95397** (3,03  $\mu$ M), mientras que frente a las células tumorales humanas MCF7 los compuestos más activos fueron la quinona **NSC9397** (12,19  $\mu$ M) y la *o*-cloro aminoquinona **XX<sub>e</sub>** (18,67  $\mu$ M).

## **6. Metodologías**

## **6.1. Metodología Bioquímica**

### **6.1.1. Inhibición enzimática**

La actividad enzimática de Cdc25B fue evaluada usando fosfato de O-Metil-fluoresceína (OMPF) como sustrato, en placas de 96 pocillos. Preparando una mezcla final de 100 $\mu$ L (50mM Tris-HCl pH 8, 50mM NaCl, 1mM DTT y 20% Glicerol), evaluando cada reacción por duplicado. La actividad fue cuantificada mediante un multifotómetro (infinite m200, tecan), excitando a 485 nm y emitiendo a 530nm, con un filtro de sensibilidad al 70%. Midiendo cada 1 minuto durante 45 minutos.

Los ensayos de inhibición se realizaron de forma similar a lo antes descrito, a excepción de que la enzima fue pre-incubada con el inhibidor a distintas concentraciones, durante 10 minutos.

Los datos fueron normalizados por la fluorescencia base del OMPF en buffer de reacción, siendo analizados mediante el programa de ajuste de curva Prism 6.01 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA). Seleccionando los mejores modelos de ajuste de curva, para cada tipo de compuesto. Además se tomó los primeros 5 minutos de reacción como los puntos para realizar una regresión lineal y obtener la Velocidad inicial ( $V_i$ ).

### **6.1.2. Propagación y obtención de células tumorales TA3**

La propagación de las células de tumor ascítico TA3 se realizó semanalmente por inyección intraperitoneal (i.p) de  $1.0 \times 10^6$  células a ratones CAF 1 Jax, y se administró Metotrexato via i.p., en dosis crecientes hasta el día de la realización de los experimentos. Después de 5-

6 días desde la inoculación y propagación, las células tumorales fueron obtenidas, una vez sacrificados los ratones, desde los fluidos ascíticos mediante incisión en el abdomen.

Luego, las células fueron suspendidas en solución buffer a una temperatura entre 0° y 4°C que contenía NaCl 150mM, KCl 5 mM y Tris-HCl 10 mM pH = 7.4 y se lavaron mediante centrifugaciones sucesivas a 180g por 5 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante por aspiración. Este procedimiento se repitió hasta eliminar la contaminación por eritrocitos.

Finalmente, el pellet resultante fue resuspendido en la misma solución buffer y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Biuret.<sup>153</sup>

### **6.1.3. Preparación de las mitocondrias y determinación de la respiración mitocondrial**

Las suspensiones mitocondriales de una concentración de 0,5 mg proteína/ml fueron preparadas desde células tumorales TA3, según procedimientos descritos previamente.<sup>154</sup>

Para determinar el efecto producido por los compuestos sobre el consumo de oxígeno, se monitoreó polarográficamente con un electrodo Clack a 25° C. El medio de respiración contenía sacarosa 200 mM, KCl 50 mM, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> mM, MgCl 2 mM, EGTA 0,5 mM y HEPES 3 mM, a pH 7,4 y los respectivos sustratos mas 0,25 mM de ADP. La mitocondria fue estimulada con sustratos para el complejo I de la cadena respiratoria: 4,2 mM de glutamato + 4,2 mM de malato y se añadieron concentraciones crecientes de los compuestos a estudiar. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta con al menos tres experimentos independientes.

---

<sup>153</sup> Moreadith, R.W.; Fiskum, G.; Anal. Biochem. **1984**, 137, 360.

<sup>154</sup> Cordano, G.; Pezoa, J.; Muñoz, S.; Rivera, E; Medina, J.; Núñez-Vergara, L.; Pavani, M.; Guerrero, A.; Ferreira, J.; Eur. J. Pharm. Sci. **2002**, 16, 255.

#### 6.1.4. Cultivo celular

Las células tumorales de adenocarcinoma mamario de ratón TA3 y las células normales de epitelio mamario de ratón MM3MG fueron cultivadas en medio DMEM + 10% Suero Fetal Bovino (SFB). Las células humanas (MCF7 y HME1) fueron cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 10% SFB inactivado por calor. Se sembraron 100.000 células/pocillo en placas de 96-well. Después de 24h, el medio fue retirado y estimuladas con concentraciones crecientes de los compuestos. Fueron incubadas por 48h, una vez terminada la incubación, el medio fue removido y lavadas con PBS dos veces. Luego fueron incubadas con MTT por 1h. Al termino de este tiempo, para solubilizar los cristales de formazan, fue agregado Triton x100 m HCl. La absorbancia fue leída en un lector de placa a 540 nM.

#### 6.2. Metodología Computacional

Los cálculos fueron llevados a cabo usando la funcional DFT B3LYP,<sup>155-156</sup> junto con el conjunto base 6-31G(d,p).<sup>157</sup> No se encontraron frecuencias imaginarias en las geometrías optimizadas, lo cual indica que son un mínimo real de la superficie de energía potencial. Todos los cálculos fueron llevados a cabo usando el programa Gaussian 03<sup>158</sup>, corriendo un cluster Microsystem de blades. Los calculos de los descriptores de reactividad DFT fueron llevados a cabo usando el programa Fukui2.<sup>159</sup>

---

<sup>155</sup> Becke, A.D.; *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648.

<sup>156</sup> Stephens, P.J.; Devlin, F.J.; Chahalowsky, C.F.; Frisch, M.J.; *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11623.

<sup>157</sup> Hehre, W.J.; Radom, L.; Schleyer, P.V.R.; Pople, J. in *Ab Initio Molecular Orbital Theory* **1986** (Ed. Wiley: New York)

<sup>158</sup> Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Pople, J.A. et all.; Gaussian03, Revision E. 01, Gaussian, Inc.; Wallingford, CT, **2004**.

<sup>159</sup> Chamorro, E.; Perez, P.; *J. Chem. Phys.* **2005**, 123, 114107.

### 6.3. Metodología sintética

Los puntos de fusión no corregidos fueron determinados en un aparato de placa caliente Kofler. Los espectro IR fueron obtenidos en un espectrómetro FT-IR Bruker IFS 55 en pastillas de KBr; los números de onda son reportados en  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker DRX-300 (300 y 75 Mhz) en  $\text{CDCl}_3$ . Los desplazamientos químicos son dados en ppm ( $\delta$ ) relativos al TMS como estándar interno. Los valores de las J de acoplamiento son dados en Hz. Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) fueron obtenidos en un espectrómetro de masas Thermo Finnigan, modelo MAT 95XP, cuando el método ionización fue impacto electrónico (IE), y en un espectrómetro de masas Water LCT Premier XE Mass, cuando el método de ionización fue ionización láser asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

#### 6.3.1. Procedimiento General Sintético

La reacción de las quinonas **I** y **II** con las aminas **IV<sub>a</sub>** y **V<sub>a</sub>** fueron llevadas a cabo usando las condiciones A y B, descritas abajo. La reacción de la quinona **III** con las aminas **V<sub>a</sub>**, **V<sub>j</sub>**, **V<sub>p</sub>**, **V<sub>r</sub>** fueron llevadas a cabo usando la condición B. La reacción de la quinona **II** las aminas **IV<sub>b</sub>** a **IV<sub>g</sub>** y **V<sub>b</sub>** a **V<sub>n</sub>** fueron llevadas a cabo usando las condiciones B. Los compuestos **II**,<sup>160</sup> **VIII-IX**, **XI**,<sup>161</sup> **XVI-XIX**<sup>148</sup> han sido previamente descritos.

---

<sup>160</sup> Araya-Maturana, R.; Cassels, B.K.; Delgado-Castro, T.; Valderrama, J.A.; Weiss-López, B.E.; *Tetrahedron* **1999**, 55,637.

<sup>161</sup> Srivastava, S.C.; Hornemann, U.; *Angew. Chem.* **1976**, 88, 87.

Condiciones:

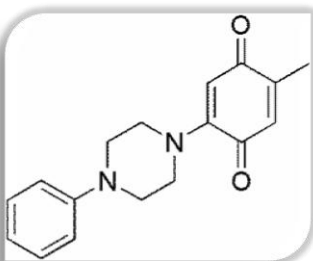
A) Disolviendo los reactivos en diclorometano y dejando reaccionar a temperatura ambiente durante toda la noche.

B) Usando agua como medio de reacción, agitando a temperatura ambiente toda la noche



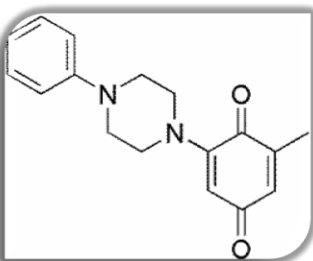
## 6.4. Caracterización de los compuestos

### 6.4.1. 2-Metil-5-(4-fenil-piperazin-1-il)-[1,4]benzoquinona (VI)



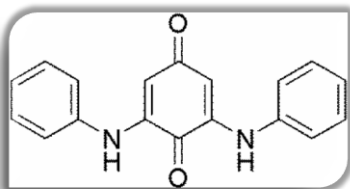
Sólido rojo; p.f. 107-109 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  762(C-H<sub>ar</sub>), 1024(C-N), 1643(C=O);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  2.03 (d, 3H,  $J = 1.3$  Hz), 3.32 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz), 3.60 (t, 4H,  $J = 5.4$  Hz), 5.79 (s, 1H), 6.43 (d, 1H,  $J = 1.5$  Hz), 6.89 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz), 6.93 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz), 7.29 (t, 2H,  $J = 7.9$  Hz),  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  15.60, 48.40, 48.66, 108.99, 116.08, 120.26, 129.22, 132.03, 146.56, 150.58, 151.57, 184.94, 186.37; EMAR(TOF)  $m/z$  calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H<sup>+</sup> 283.1447, encontrado 283.1441.

### 6.4.2. 2-Metil-6-(4-fenil-piperazin-1-il)-[1,4]benzoquinona (VII)



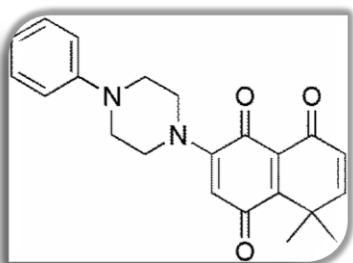
Sólido rojo; mp 65-67 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  747(C-H<sub>ar</sub>), 1024(C-N), 1645(C=O);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  2.03 (d, 3H,  $J = 1.6$  Hz); 3.31 (q, 4H,  $J = 5.0$  Hz, 7.1 Hz); 3.53 (q, 4H,  $J = 5.0$  Hz, 6.9 Hz); 5.76 (d, 1H,  $J = 2.5$  Hz); 6.47 (q, 1H,  $J = 7.3$  Hz, 9.8 Hz); 6.92 (m, 3H); 7.28 (q, 2H,  $J = 7.5$  Hz, 8.9 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  15.94, 48.64, 48.76, 109.34, 116.18, 120.37, 129.26, 133.83, 144.03, 150.6, 152.15, 185.28, 186.52;  $m/z$  (TOF) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H<sup>+</sup> 283.1447, encontrado 283.1444.

#### 6.4.3. 3,5-Dianilin-2-metilbenzo-1,4-quinona (X)



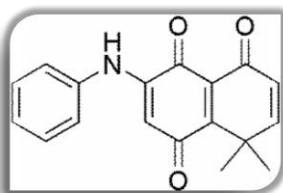
Sólido rojo; mp 123-125 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  751(C-H<sub>ar</sub>), 1573(C=O), 3438(N-H);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  2.04 (s, 3H,  $J = 1.2$  Hz), 6.17 (s, 1H), 6.90 (dd, 2H,  $J = 1.1$  Hz, 8.4 Hz), 7.04 (m, 4H), 7.34 (m, 4H), 7.61 (s, 1H), 8.47 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  13.79, 90.59, 111.07, 120.67, 120.92, 122.60, 123.79, 124.53, 128.75, 128.86, 129.36, 138.79, 140.09, 140.54, 145.88, 149.52, 154.83, 182.24;  $m/z$  (TOF) calculado para C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H<sup>+</sup> 305.1290, encontrado 305.1293.

#### 6.4.4. 8,8-Dimetil-3-(4-fenilpiperazin-1-il)naftalen-1,4,5(8H)-triona (XII)



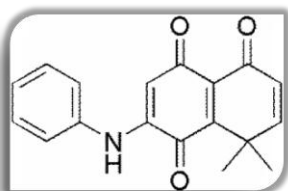
Sólido rojo; mp 144-145 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  748(C-H<sub>ar</sub>), 1233(C-N), 1694(C=O);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.50 (s, 6H), 3.26 (t, 4H,  $J = 4.9$ ), 3.55 (t, 4H,  $J = 5.3$ ), 5.70 (s, 1H), 6.23 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz), 6.69 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz), 6.85 (t, 3H,  $J = 7.4$  Hz), 7.22 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 9.1$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.17, 38.69, 47.92, 48.74, 106.87, 116.17, 120.42, 126.68, 129.25, 132.92, 150.42, 152.70, 156.36, 158.34, 182.80, 184.03;  $m/z$  (TOF) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 385.1528, encontrado 385.1526.

#### 6.4.5. 3-Anilin-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XIV)



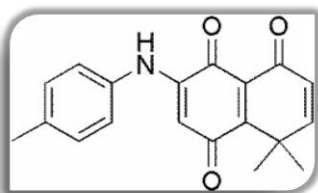
Sólido rojo; mp 158-160 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  832(C-H<sub>ar</sub>), 1699(C=O), 3250(N-H);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.59 (s, 6H), 6.19 (s, 1H), 6.30 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 6.76 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.21 (q, 3H,  $J = 6.4$  Hz, 8.3 Hz), 7.33 (s, 1H), 7.40 (t, 2H,  $J = 8.1$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.70, 30.19, 102.64, 122.58, 125.87, 126.93, 128.99, 129.70, 137.00, 142.32, 157.94, 159.30, 181.17, 182.63, 184.95;  $m/z$  (TOF) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 316.0950, encontrado 316.0965.

#### 6.4.6. 2-Anilin-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XV)



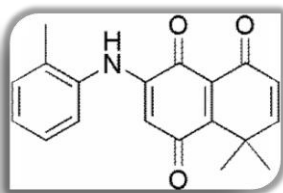
Sólido rojo; mp 129-131 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  762(C-H<sub>ar</sub>), 1690(C=O), 3314(N-H);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.57 (s, 6H), 6.17 (s, 1H), 6.35 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.75 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.19 (m, 3H), 7.33 (s, 1H), 7.40 (t, 2H,  $J = 7.9$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.12, 37.25, 104.70, 122.35, 122.60, 122.81, 125.63, 126.36, 129.74, 136.62, 138.70, 152.27, 153.56, 156.80, 178.15, 180.33, 185.02;  $m/z$  (TOF) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>H<sup>+</sup> 294.1127, encontrado 294.1130.

#### 6.4.7. 3-(p-Toluidin)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>a</sub>)



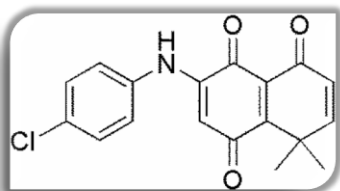
Sólido rojo; mp 152-153 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  781(C-H<sub>ar</sub>), 1601(C=O), 3243(N-H); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ H 1.58 (s, 6H), 2.34 (s, 3H), 6.12 (s, 1H), 6.28 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz), 6.74 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz), 7.08 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz), 7.19 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz), 7.29 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ C 20.89, 26.64, 39.12, 102.25, 122.60, 126.84, 130.16, 134.29, 135.81, 142.57, 157.85, 159.37, 181.16, 182.58, 184.72; m/z (TOF) calculado para C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 330.1105, encontrado 330.1107.

#### 6.4.8. 3-(o-Toluidin)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>b</sub>)



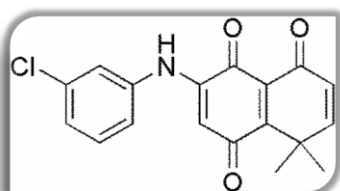
Sólido rojo; mp 145-147 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  834(C-H<sub>ar</sub>), 1610(C=O), 3318(N-H); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ H 1.60 (s, 6H); 2.26 (s, 3H); 5.82 (s, 1H); 6.32 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 6.78 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 7.16 (t, 1H,  $J = 3.8$  Hz); 7.21 (dd, 1H,  $J = 2.2$  Hz, 6.7 Hz); 7.24 (t, 1H,  $J = 1.9$  Hz); 7.28 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ C 17.64, 26.70, 39.23, 102.30, 124.27, 126.90, 127.06, 128.90, 131.39, 132.92, 135.02, 143.12, 158.01, 159.52, 181.32, 182.75, 182.75, 184.70. m/z (IE) calculado para C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> 307.12084, encontrado 307.12063.

#### 6.4.9. 3-(p-Clorofenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>c</sub>)



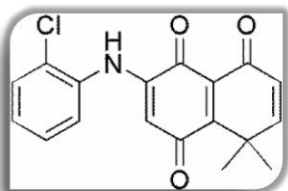
Sólido rojo; mp 151-153 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  827(C-H<sub>ar</sub>), 1697(C=O), 3261(N-H);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.59 (s, 6H), 6.13 (s, 1H), 6.30 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.75 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.14 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 7.29 (s, 1H), 7.56 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.71, 39.19, 102.98, 123.83, 126.97, 135.64, 142.12, 157.92, 159.19, 180.95, 182.52, 184.97;  $m/z$  (IE) calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$  327.0662, encontrado 327.0664.

#### 6.4.10. 3-(m-Clorofenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>d</sub>)



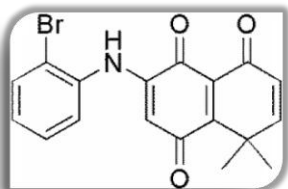
Sólido rojo; mp 130-131 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  684(C-H<sub>ar</sub>), 1694(C=O), 3245(N-H);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.58 (s, 6H), 6.20 (s, 1H), 6.30 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.76 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.09 (dd, 1H,  $J = 1.1$  Hz, 8.1 Hz), 7.17 (dd, 1H,  $J = 1.8$  Hz,  $J = 7.1$  Hz), 7.21 (t, 1H,  $J = 1.9$  Hz), 7.32 (t, 2H,  $J = 8.1$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.67, 39.15, 103.37, 120.53, 122.40, 125.81, 122.40, 125.81, 126.95, 130.70, 135.34, 138.36, 141.81, 157.90, 159.02, 180.84, 182.47, 185.09;  $m/z$  (IE) calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$  327.0662, encontrado 327.0660.

#### 6.4.11. 3-(o-Clorofenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>e</sub>)



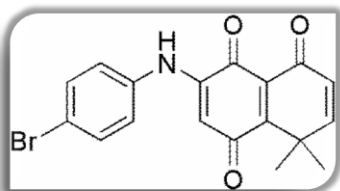
Sólido rojo; mp 101-103 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  690(C-H<sub>ar</sub>), 1682(C=O), 3115(N-H); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ H 1.58 (s, 6H), 6.14 (s, 1H), 6.30 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz), 6.75 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.14 (td, 1H,  $J = 1.6$  Hz, 7.6 Hz), 7.30 (td, 1H,  $J = 1.3$  Hz, 8.2 Hz), 7.37 (dd, 1H,  $J = 1.6$  Hz, 8.0 Hz), 7.46 (dd, 1H,  $J = 1.3$  Hz, 7.9 Hz), 7.59 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ C 26.64, 39.10, 103.50, 122.89, 126.38, 126.95, 127.68, 130.44, 134.13, 141.50, 157.85, 158.89, 180.71, 182.49, 185.16; m/z (TOF) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub>H<sup>+</sup> 328.0740 encontrado 328.0737.

#### 6.4.12. 3-(o-Bromofenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>f</sub>)



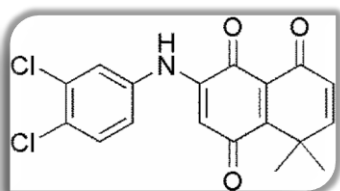
Sólido rojo; mp 97-99 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  762(C-H<sub>ar</sub>), 1689(C=O), 3301(N-H); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ H 1.58 (s, 6H), 6.14 (s, 1H), 6.31 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.76 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.07 (m, 1H,  $J = 3.1$  Hz, 6.0 Hz, 8.3 Hz), 7.35 (t, 2H,  $J = 3.4$ ), 7.56 (s, 1H), 7.64 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ C 17.64, 26.70, 39.23, 102.30, 124.27, 126.90, 127.06, 128.90, 131.39, 132.92, 135.02, 143.12, 158.01, 159.52, 181.32, 182.75, 184.70; m/z (IE) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>BrNO<sub>3</sub> 371.0157, encontrado 371.0146.

#### 6.4.13. 3-(p-Bromofenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>g</sub>)



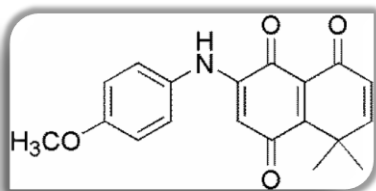
Sólido rojo; mp 168-170 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  818(C-H<sub>ar</sub>), 1678(C=O), 3298(N-H);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.58 (s, 6H), 6.15 (s, 1H), 6.29 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.76 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.09 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz), 7.28 (s, 1H), 7.52 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta\text{C}$  27.12, 39.61, 103.48, 119.25, 124.46, 127.37, 129.36, 133.23, 136.60, 142.38, 158.35, 159.58, 181.35, 182.94, 185.40;  $m/z$  (TOF) calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{BrNa}^+$  394.0055, encontrado 394.0049.

#### 6.4.14. 3-(3,4-Diclorofenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>h</sub>)



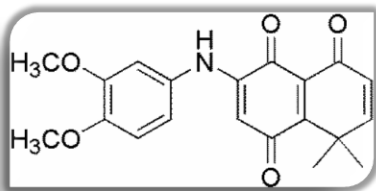
Sólido rojo; mp 175–177 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  833(C-H<sub>ar</sub>), 1695(C=O), 3440(N-H);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.59 (s, 6H), 6.17 (s, 1H), 6.31 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz), 6.77 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 7.07 (dd, 1H,  $J = 2.6$  Hz, 8.6 Hz), 7.29 (s, 1H), 7.34 (d, 1H,  $J = 2.6$  Hz), 7.47 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.71, 39.19, 103.62, 121.68, 124.01, 127.00, 129.42, 131.34, 133.73, 136.67, 141.62, 157.93, 159.01, 180.70, 182.42, 185.09;  $m/z$  (IE) calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_3$  361.0272, encontrado 361.02666.

#### 6.4.15. 3-(p-Metoxifenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>i</sub>)



Sólido rojo; mp 145-147 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  821(C-H<sub>ar</sub>), 1609(C=O), 3316(N-H); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ H 1.58 (s, 6H), 3.80 (s, 3H), 6.00 (s, 1H), 6.28 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.74 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.91 (d, 2H,  $J = 8.9$  Hz), 7.13 (d, 2H,  $J = 8.9$  Hz), 7.22 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ C 26.67, 29.63, 39.21, 55.48, 101.79, 114.85, 124.73, 126.87, 128.83, 129.53, 143.18, 157.74, 157.97, 159.61, 181.26, 182.72, 184.60;  $m/z$  (TOF) calculado para C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>H<sup>+</sup> 324.1236, encontrado 324.1232.

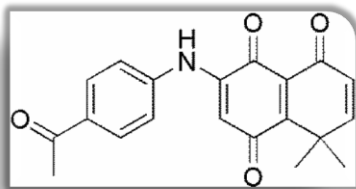
#### 6.4.16. 3-(3,4-Dimetoxifenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>j</sub>)



Sólido rojo; mp 129-131 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  827(C-H<sub>ar</sub>), 1628(C=O), 3329(N-H); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ H 1.59 (s, 6H), 3.87 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 6.05 (s, 1H), 6.30 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.70 (d, 1H,  $J = 2.3$  Hz), 6.75 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.77 (dd, 1H,  $J = 5.6$  Hz, 10.1 Hz), 6.87 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz), 7.22 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ C 26.73, 29.66, 39.25, 56.07, 102.07, 107.23, 111.57, 115.61, 126.91, 128.88, 129.82, 143.11, 147.44, 149.70, 157.99, 159.61, 181.25, 182.72, 184.69;  $m/z$  (IE) calculado para C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> 353.1263, encontrado 353.12736.

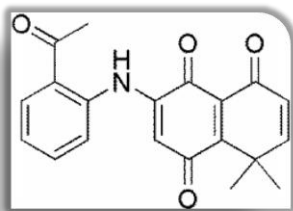


#### 6.4.17. 3-(p-Acetilfenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XX<sub>k</sub>)



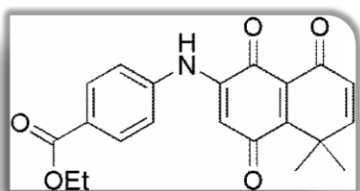
Sólido rojo; mp 195-196 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  827 (C-H<sub>ar</sub>), 1693(C=O), 3425(N-H);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.58 (s, 6H), 2.58 (s, 3H), 6.30 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 6.37 (s, 1H), 6.76 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 7.29 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz), 7.57 (s, 1H), 7.99 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.44, 26.64, 39.11, 104.49, 120.90, 126.95, 128.99, 130.13, 133.52, 140.96, 141.67, 157.87, 158.81, 180.76, 182.36, 185.23, 196.44;  $m/z$  (TOF) calculado para C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>H<sup>+</sup> 336.1236 encontrado 336.1231.

#### 6.4.18. 3-(o-Acetilfenilamino)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XXI)



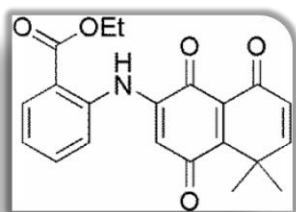
Sólido rojo; mp 160-162 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  751(C-H<sub>ar</sub>), 1698(C=O), 3410(N-H);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.58 (s, 6H), 2.64 (s, 3H), 6.30 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 6.49 (s, 1H), 6.74 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.16 (td, 1H,  $J = 1.8$  Hz, 6.7 Hz), 7.53 (q, 2H,  $J = 6.6$  Hz, 8.1 Hz), 7.92 (dd, 1H,  $J = 1.0$  Hz, 8.5 Hz), 11.10 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  29.34, 31.90, 38.94, 105.56, 120.63, 123.19, 125.89, 127.11, 132.27, 133.97, 139.80, 147.78, 157.59, 180.73, 182.44, 185.77, 200.87;  $m/z$  (TOF) calculado para C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>H<sup>+</sup> 336.1236 encontrado 336.1241.

**6.4.19. 4-(5,5-dimetil-1,4,8-trioxo-1,4,5,8-tetrahidronaftalen-2-ilamino)benzoato de etilo (XX<sub>m</sub>)**



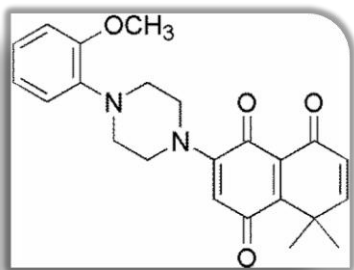
Sólido rojo; mp 160-162 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  836(C-H<sub>ar</sub>), 1698(C=O), 3410(N-H);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.38 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 1.59 (s, 6H), 4.36 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz), 6.39 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 6.35 (s, 1H), 6.77 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz), 7.26 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz), 7.52 (s, 1H), 8.07 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  14.29, 26.67, 39.14, 61.09, 104.27, 120.90, 126.98, 127.55, 129.00, 131.26, 136.27, 136.60, 141.10, 141.38, 157.37, 157.88, 158.89, 165.63, 180.82, 182.40, 185.22; m/z (TOF) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>H<sup>+</sup> 366.1341 encontrado 366.1331.

**6.4.20. 2-(5,5-dimetil-1,4,8-trioxo-1,4,5,8-tetrahidronaftalen-2-ylamino)benzoato de etilo (XX<sub>n</sub>)**



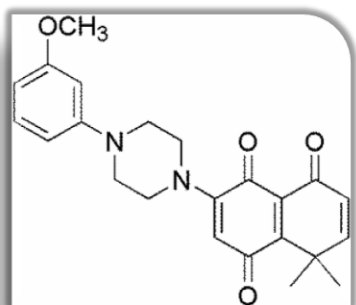
Sólido rojo; mp 115-117 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  758(C-H<sub>ar</sub>), 1703(C=O), 3435(N-H);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.41 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 1.59 (s, 6H); 6.23 (s, 6H), 4.41 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz), 6.30 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 6.47 (s, 1H), 6.74 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 7.14 (dt, 1H,  $J = 1.4$  Hz, 7.1 Hz), 7.51 (m, 2H), 8.07 (dd, 1H,  $J = 1.4$  Hz, 7.8 Hz), 10.35 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  14.22, 26.63, 38.97, 61.70, 104.60, 119.93, 120.47, 123.46, 127.04, 129.21, 132.17, 133.62, 139.99, 141.50, 157.65, 158.39, 166.65, 180.84, 182.44, 185.65; m/z (TOF) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> 365.1263 C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> 365.12632, encontrado 365.12632

#### 6.4.21. 3-(4-(2-Metoxifenil)piperazin-1-il)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XXI<sub>a</sub>)



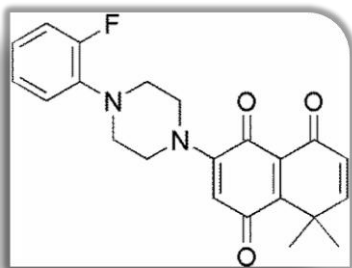
Sólido rojo; mp 138-139 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  757(C-H<sub>ar</sub>), 1219(C-N), 1699(C=O);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.55 (s, 6H); 3.16 (t, 4H,  $J = 4.8$  Hz); 3.61 (t, 4H,  $J = 4.8$  Hz); 3.86 (s, 3H); 5.75 (s, 1H); 6.27 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 6.75 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 6.87 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz); 6.91 (d, 2H,  $J = 4.2$  Hz); 7.03 (m, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.18, 38.72, 48.36, 50.28, 55.42, 106.89, 111.28, 118.42, 121.05, 123.70, 126.68, 133.09, 140.22, 152.17, 153.17, 156.37, 158.42, 182.48, 182.97, 184.06;  $m/z$  (TOF) calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$  415.1634, encontrado 415.1636.

#### 6.4.22. 3-(4-(3-Metoxifenil)piperazin-1-il)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XXI<sub>b</sub>)



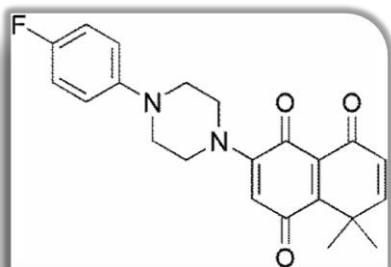
Sólido rojo; mp 133-135 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  754(C-H<sub>ar</sub>), 1209(C-N), 1695(C=O);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.54 (s, 6H); 3.30 (t, 4H,  $J = 4.8$  Hz); 3.58 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz); 3.77 (s, 3H); 5.74 (s, 1H); 6.27 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 6.47 (m, 3H); 6.74 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 7.17 (t, 1H,  $J = 7.96$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.11; 38.65; 47.77; 48.48; 55.13; 102.53; 104.91; 106.75; 108.70; 126.61; 129.92; 132.83; 151.70; 152.60; 156.32; 158.33; 160.54; 182.37; 182.75; 183.95.  $m/z$  (TOF) calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$  415.1634, encontrado 415.1643.

**6.4.23. 3-(4-(2-Fluorofenil)piperazin-1-il)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XXI<sub>c</sub>)**



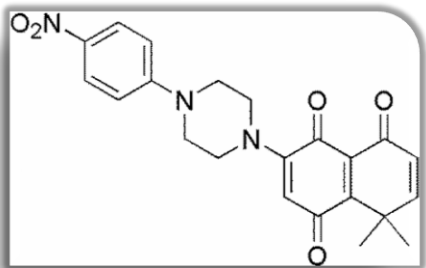
Sólido rojo; mp 106-107 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  758(C-H<sub>ar</sub>), 1232(C-N), 1700(C=O);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.55 (s, 6H); 3.19 (t, 4H,  $J = 4.8$  Hz); 3.59 (t, 4H,  $J = 5.1$  Hz); 5.76 (s, 1H); 6.28 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 6.74 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz); 7.00 (m, 4H);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.13; 38.65; 49.18; 50.09; 107.15; 116.09; 116.36; 119.11; 123.21; 124.53; 126.65; 133.00; 139.11; 152.95; 154.00; 156.24; 157.26; 158.31; 171.04; 182.36; 182.80; 184.09; m/z (TOF) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>FNa<sup>+</sup> 403.1434, encontrado 403.1435.

**6.4.24. 3-(4-(4-Fluorofenil)piperazin-1-il)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XXI<sub>d</sub>)**



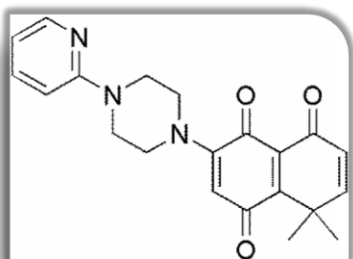
Sólido rojo; mp 170-172 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  828(C-H<sub>ar</sub>), 1207(C-N), 1695(C=O);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.56 (s, 6H); 3.22 (t, 4H,  $J = 4.9$  Hz); 3.59 (t, 4H,  $J = 5.3$  Hz); 5.77 (s, 1H); 6.29 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 6.76 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz); 6.88 (m, 2H); 6.98 (m, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.18; 38.73; 48.01; 49.91; 107.16; 115.59; 115.88; 118.27; 126.71; 132.99; 147.18; 152.76; 156.01; 156.33; 158.39; 159.19; 182.44; 182.81; 184.12; m/z (TOF) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>FNa<sup>+</sup> 403.1434, encontrado 403.1444.

#### 6.4.25. 3-(4-(4-Nitrofenil)piperazin-1-il)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XXI<sub>e</sub>)



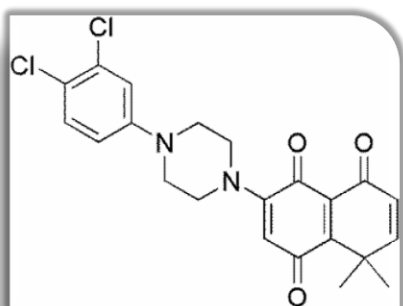
Sólido rojo; mp 180-182 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  818(C-H<sub>ar</sub>), 1230(C-N), 1296(N-O), 1563(N-O), 1701(C=O); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ H 1.56 (s, 6H); 3.62 (m, 4H); 3.69 (m, 4H); 5.72 (s, 1H); 6.29 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz); 6.77 (m, 3H); 8.15 (d, 2H,  $J = 9.34$  Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ C 26.21; 38.77; 45.84; 47.00; 106.70; 112.21; 126.00; 126.71; 132.64; 138.91; 153.79; 156.48; 158.43; 182.40; 182.55; 184.03; m/z (TOF) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup> 430.1379, encontrado 430.1374.

#### 6.4.26. 3-(4-(Piridin-2-il)piperazin-1-yl)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XXI<sub>f</sub>)



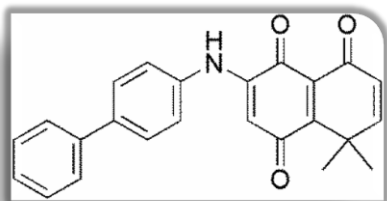
Sólido rojo; mp 141-143 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  772(C-H<sub>ar</sub>), 1238(C-N), 1696(C=O); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ H 1.54 (s, 6H); 3.59 (q, 4H,  $J = 4.2$  Hz, 7.5 Hz); 3.70 (t, 4H,  $J = 4.2$  Hz, 7.5 Hz); 5.72 (s, 1H); 6.27 (d, 1H,  $J = 10.3$  Hz); 6.60 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz); 6.64 (q, 1H,  $J = 5.5$  Hz, 7.1 Hz); 6.74 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz); 7.49 (m, 1H), 8.17 (dd, 1H,  $J = 1.1$  Hz, 4.8 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ C 26.12; 38.67; 44.19; 47.51; 106.39; 106.76; 113.77; 126.61; 132.73; 137.64; 147.90; 152.51; 156.45; 158.34; 158.50; 182.39; 182.78; 183.84; m/z (TOF) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>H<sup>+</sup> 364.1661, encontrado 364.1669.

**6.4.27. 3-(4-(3,4-diclorofenil)piperazin-1-il)-8,8-dimetilnaftalen-1,4,5(8H)-triona (XXI<sub>g</sub>)**



Sólido rojo; mp 142-144 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  662(C-H<sub>ar</sub>), 1228(C-N), 1695(C=O);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.56 (s, 6H); 3.31 (t, 4H, J = 4.9 Hz); 3.60 (t, 4H, J = 4.9 Hz); 5.75 (s, 1H); 6.29 (d, 1H, J = 10.1 Hz); 6.74 (m, 2H); 6.94 (d, 1H, J = 2.9 Hz); 7.30 (d, 1H, J = 8.9 Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.21; 38.75; 47.60; 48.16; 107.25; 115.32; 117.37; 123.05; 126.74; 130.64; 132.91; 133.01; 149.77; 152.45; 156.36; 158.37; 182.42; 182.69; 184.16; m/z (TOF) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>H<sup>+</sup> 431.0930 encontrado 431.0929.

**6.4.28. 3-(Bifenil-4-ilamino)-8,8-dimetilnaphthalene-1,4,5(8H)-triona (XXII)**



Sólido rojo; p.f. 190-193 °C;  $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$  840, 1695, 3332;  $^1\text{H-RMN}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta\text{H}$  1.61 (s, 6H); 6.27 (s, 1H); 6.31 (d, 1H, J = Hz); 6.77 (d, 1H, J = Hz); 7.29 (d, 2H, J = Hz); 7.36 (tt, 1H, J<sub>1</sub> = Hz, J<sub>2</sub> = Hz, J<sub>3</sub> = Hz); 7.41 (s, 1H); 7.45 (t, 2H, J = Hz); 7.58 (d, 2H, J = Hz); 7.63 (d, 2H, J = Hz);  $^{13}\text{C-RMN}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta\text{C}$  26.74; 39.24; 102.95; 122.66; 126.91; 126.98; 127.59; 128.31; 128.91; 136.26; 138.74; 139.74; 142.09; 157.97; 159.38; 181.17; 182.65; 184.95.

## **7. Anexo**

## 7.1. Anilquinonas como agentes antifúngicos

Además de los estudios presentados en esta tesis, los compuestos también fueron estudiados como agentes antifúngicos. El estudio antifúngico frente al hongo *Botrytis cinerea* fue llevado a cabo por el grupo de las profesoras Milena Cotoras y Leonora Mendoza de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago.

El hongo *Botrytis cinerea* es un fitopatógeno común, que ataca flores, frutos, hojas y tallos de más de 200 especies de plantas<sup>162</sup>. El continuo uso de fungicidas comerciales tales como dicarboximidias y benzoimidazoles ha causado la aparición de cepas altamente resistentes de *B. cinerea* y la contaminación del medio ambiente<sup>163</sup>. Los benzoimidazoles son inhibidores específicos del ensamble de microtúbulos<sup>164</sup> y las dicarboximidias causan significativo daño celular y peroxidación lipídica en el hongo<sup>165</sup>. En Chile, este patógeno genera importantes problemas fitosanitarios que provocan grandes pérdidas económicas en la producción de frutas.

En la búsqueda de nuevos compuestos fungicidas, se han reportado fenilpirroles, espiroquetalaminas, oxazolidinedionas y anilipirimidinas<sup>166</sup>. Las anilipirimidinas han resultado particularmente potentes frente a la *B. cinerea*, estos compuestos inhiben la secreción de enzimas hidrolíticas del hongo, las cuales juegan un importante papel en el proceso infeccioso<sup>167</sup>. Sin embargo, durante los últimos años han aparecido cepas del hongo

---

<sup>162</sup>Elad, Y.; Evensen, K.; *Phytopathology* **1995**, 85, 637.

<sup>163</sup>Latorre, B.; Flores, V.; Sara, A. M.; Roco, A.; *Plant Dis.* **1994**, 7, 990.

<sup>164</sup>Yarden, O.; Katan, T.; *Phytopathology* **1993**, 83, 1478.

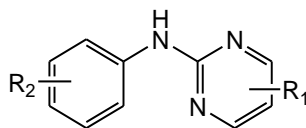
<sup>165</sup>Lee, H.; Choi, G.; Cho, K.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 737.

<sup>166</sup>Gullino, M.; Leroux, P.; Smith, C.; *Crop Prot.* **2000**, 19, 1.

<sup>167</sup>Millington, R. J.; Richardson, C.; *J. Pestic.Sci.* **1995**, 45, 43.



resistentes a las anilipirimidinas<sup>168</sup>, por lo que resulta necesario la búsqueda de nuevos compuestos anti-Botrytis.



**Figura 41. Anilipirimidinas.**

En cuanto a quinonas, existen pocos estudios sobre su actividad frente a *B. cinérea*. El único trabajo que hemos encontrado en la literatura, corresponde a uno previo de nuestro laboratorio, donde se estudiaron algunas quinonas tricíclicas junto con algunas hidroquinonas, frente al hongo *B. cinérea*.<sup>169</sup> Los resultados mostraron que las quinonas eran más potentes que las hidroquinonas, llegando una de ellas al mismo valor de dosis media efectiva (ED<sub>50</sub>) que la iprodiona (~35 µg/mL), un anti-fúngico comercial usado como control. El estudio sugirió que las quinonas actuaban sobre la cadena de transporte de electrones del hongo.

Teniendo en cuenta lo anterior, consideramos que las aminoquinonas podrían ser interesantes frente al hongo *B. cinérea*, en particular las anilinquinonas, que unen un núcleo quinónico con uno de anilina, también presente en otras moléculas activas frente a este hongo, como son las anilipirimidinas.

Un análisis inicial de la actividad de la anilinquinona y 1-fenilpiperazinquinona, mostró que la primera era mucho más potente frente al hongo, tal como se podía suponer del análisis

<sup>168</sup> Bardas, G. A.; C. K. Myresiotis, Karaoglanidis, G. S.; *Phytopathology* **2008**, 98, 443.

<sup>169</sup> Mendoza, L.; Araya-Maturana, R.; Cardona, W.; Delgado-Castro, T.; García, C.; Lagos C.; Cotoras, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 10080.

anterior. Por ello se llevó a cabo el estudio con la serie de derivados anilquinónicos sintetizados en la parte anterior de este trabajo. El efecto de los compuestos sobre el crecimiento micelial se analizó utilizando dos cepas de *B. cinerea* (U29 y B05.10). Los compuestos fueron adicionados al medio de cultivo y se determinó el valor de IC<sub>50</sub> (Tabla 16).

**Tabla 16.** Efecto de algunas anilín-quinonas sobre el crecimiento micelial de las cepas U29 y B05.10 de *B. cinerea*, así como la cepa mutante ΔB05.10 que no expresa la bomba de expulsión ABC.

Compuesto	R	U29 (μg/mL)*	B05.10 (μg/mL)*	ΔB05.10 (μg/mL)*
XIV	H	5,5 ± 0,6	8,1 ± 1,5	16,3 ± 1,9
XXa	<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	4,2 ± 0,6	4,1 ± 0,1	5,9 ± 0,6
XXb	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	6,1 ± 1,4	6,2 ± 0,6	N.D.
XXc	<i>p</i> -Cl	4,3 ± 0,4	5,1 ± 0,4	N.D.
XXd	<i>m</i> -Cl	13,0 ± 0,8	8,3 ± 0,7	N.D.
XXe	<i>o</i> -Cl	15,7 ± 0,6	16,2 ± 2,5	9,4 ± 0,3
XXf	<i>o</i> -Br	23,5 ± 2,5	19,0 ± 0,9	8,9 ± 2,4
XXg	<i>p</i> -Br	30,8 ± 4,6	4,1 ± 0,6	4,7 ± 0,1
XXh	3,4-diCl	3,9 ± 0,3	5,6 ± 0,8	N.D.
XXi	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	15,1 ± 2,7	5,4 ± 0,7	N.D.
XXj	3,4-diOCH <sub>3</sub>	33,7 ± 1,7	6,3 ± 0,4	N.D.
XXk	<i>p</i> -COCH <sub>3</sub>	7,8 ± 0,0	7,5 ± 2,2	5,8 ± 1,4
XXm	<i>p</i> -CO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,1 ± 0,1	12,8 ± 2,2	5,4 ± 1,5

\* Los valores de IC<sub>50</sub> corresponden al promedio de mínimo 3 experimentos ± la desviación estándar. N.D.= No determinado.

Además se analizó el efecto de las bombas de expulsión ABC (ATP-binding cassette) sobre la sensibilidad de *B. cinerea* al compuesto con mayor actividad anti-fúngica. Los transportadores ABC son proteínas de transmembrana que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para llevar sustancias a través de membranas, entre otros procesos.<sup>170</sup> Los transportadores ABC están involucrados en la resistencia de tumores, en la fibrosis cística y otro tipo de enfermedades humanas, así como también en el desarrollo de resistencia a

<sup>170</sup> Davidson, A.L.; Dassa, E.; Orelle, C.; Chen, J.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008** 72, 317.

múltiples drogas en células eucariotas y procariotas, incluidos hongos.<sup>171</sup> El efecto de los compuestos XIV, XXa, XXe, XXf, XXg, XXk y XXm sobre las bombas de expulsión ABC, se determinó comparando el efecto de estos compuestos sobre las cepas de *B. cinerea* B05.10 y una mutante que no expresa la bomba de expulsión ABC ( $\Delta$ B05.10).

Se encontró que el efecto antifúngico depende de la sustitución en el anillo aromático y de la cepa de *B. cinerea* utilizada. Los compuestos sustituidos con *o*-Br, *p*-Br y 3,4-di-OCH<sub>3</sub> (XX<sub>f</sub>, XX<sub>g</sub> y XX<sub>j</sub>), presentaron la menor actividad antifúngica para la cepa U29, Los compuestos más activos para la misma cepa fueron el XX<sub>m</sub> y XX<sub>h</sub> sustituidos con *p*-CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> y 3,4-di-Cl, respectivamente, siendo este último el que presenta mayor actividad fungitóxica. La cepa B05.10 presentó una mayor sensibilidad a los compuestos XXg (*p*-Br) y XX<sub>a</sub> (*p*-CH<sub>3</sub>), por el contrario, los compuestos sustituidos con *o*-Cl, *o*-Br y *p*-CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (XX<sub>e</sub>, XX<sub>f</sub> y XX<sub>m</sub>, respectivamente) presentaron un menor efecto antifúngico sobre esta cepa del hongo.

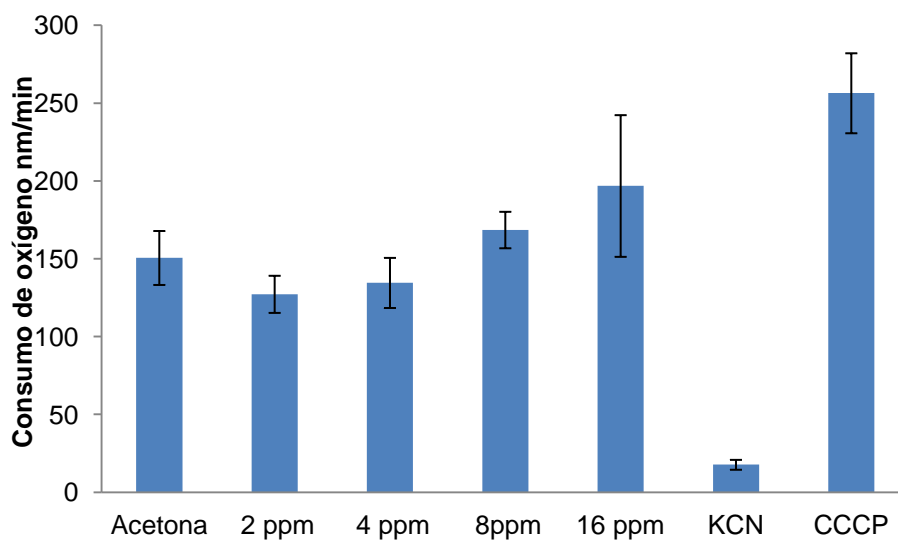
Los resultados muestran que las bombas de expulsión ABC no estarían involucradas en el proceso de detoxificación del hongo para los compuestos XIV, XX<sub>e</sub>, XX<sub>g</sub> y XX<sub>k</sub> a diferencia de los compuestos XX<sub>f</sub> y XX<sub>m</sub>, en los cuales sí estaría involucrado este mecanismo de defensa, ya que la cepa mutante presentó una mayor sensibilidad a estos compuestos.

Por otra parte, se determinó el efecto del compuesto XX<sub>g</sub> sobre la respiración celular, midiendo el consumo de oxígeno. Esporas de *B. cinerea* B05.10 suspendidas en medio mínimo suplementado con glucosa al 2% a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/mL fueron

---

<sup>171</sup> (a) Sipos, G.; Kuchler, K.; *Curr Drug Targets*. **2006**, 7, 471. (b) Leprohon, P.; Légaré, D.; Ouellette, M.; *Essays Biochem*. **2011**, 50, 121.

analizadas, se les adicionó el compuesto **XX<sub>g</sub>** a 2, 4, 8 16 ppm, los resultados obtenidos muestran que este compuesto no provocaría un efecto sobre la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa al ser comparados con los respectivos controles.



**Figura 42.** Efecto del compuesto **XX<sub>g</sub>** a 2, 4, 8 y 16 ppm sobre el consumo de oxígeno de esporas de la cepa B05.10. Controles: Solvente (Acetona), CCCP 0,05mM (Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona) y KCN 10mM, un desacoplador y un inhibidor de la cadena transportadora de electrones, respectivamente.

Se están realizando estudios, que forman parte del trabajo de una tesis de magister, para entender el mecanismo de acción de estas quinonas y las biotransformaciones de los compuestos que realiza el hongo.